UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

SCREENING BIOLOGICKÉ AKTIVITY RŮZNÝCH DRUHŮ RODU *NARCISSUS* SP. IV

Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus* sp. IV

Autor: Zuzana Valešová

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

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

Hradec Králové, květen 2023

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

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 662.

Zuzana Valešová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce PharmDr. Daniele Suchánkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu při práci v laboratoři a za cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření a identifikaci izolovaných alkaloidů. Za podporu a péči děkuji také své rodině a partnerovi.

Obsah

Seznam použitých zkratek 6
Seznam obrázků a tabulek 8
1. ÚVOD 9
2. CÍL PRÁCE 11
3. TEORETICKÁ ČÁST 12
3.1. Čeleď Amaryllidaceae 12
3.1.1. Rod *Narcissus* 12
3.1.2. Kultivary narcisů použité v experimentální části 13
3.1.2.1. *Narcissus* cv. Arkle 14
3.1.2.2. *Narcissus* cv. Blazing *S*tarlet 14
3.1.2.3. *Narcissus* cv. Dr. Alex Fleming 15
3.1.2.4. *Narcissus* cv. Heamor 16
3.1.2.5. *Narcissus* cv. Isha 16
3.1.2.6. *Narcissus* cv. Lorikeet 17
3.1.2.7. *Narcissus* cv. Woodland *S*tar 17
3.1.3. Amaryllidaceae alkaloidy 18
3.2. Biologická aktivita 21
3.2.1. Inhibice cholinesteras 21
3.2.1.1 Klinické využití inhibice cholinesteras 21
3.2.1.2. Alzheimerova choroba 23
3.2.2. Protinádorová a cytotoxická aktivita 25
3.2.3. Antimikrobiální aktivita – aktivita proti virům, bakteriím a kvasinkám 29
3.2.4. Antiparazitická aktivita 31
3.2.5. Protizánětlivá aktivita 32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 33
4.1. Příprava alkaloidních extraktů 33
4.1.1. Chemikálie 33
4.1.2. Činidla 33
4.1.3. Přístrojové vybavení 33
4.1.4. Databáze použité k vyhodnocování výsledků 33
4.1.5. Rostlinný materiál 34
4.1.6. Příprava alkaloidního extraktu 34
4.2. Identifikace alkaloidů 35
4.3. Screening biologické aktivity 36
4.3.1. Chemikálie 36

4.3.2. Činidla 36
4.3.3. Pufry 36
4.3.4. Rekombinantní enzymy 36
4.3.5. Přístrojové vybavení a použité programy 37
4.3.6. Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE 37
4.4. Izolace alkaloidů ze vzorku AL-730 38
4.4.1. Chemikálie 38
4.4.2. Činidla 38
4.4.3. Přístrojové vybavení 39
4.4.4. Preparativní tenkovrstvá chromatografie 39
4.4.4.1. Zpracování frakce AL-730-4 42
4.4.4.2. Zpracování podfrakce AL-730-4-1 43
4.4.5. Identifikace látek z extraktu AL-730 44
4.4.5.1. NMR analýza 44
4.4.5.2. Optická otáčivost 44
5. VÝSLEDKY 45
5.1. Chromatogramy jednotlivých alkaloidních extraktů 45
5.2. Přehled obsažených alkaloidů v extraktech 52
5.3. Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE 53
5.4. Izolované alkaloidy z extraktu AL-730 54
5.4.1. Frakce AL-730-2 – hippeastrin 54
5.4.2. Frakce AL-730-3 – haemanthamin 55
5.4.3. Podfrakce AL-730-4-1-1 – lykoramin 56
6. DISKUZE A ZÁVĚR 57
7. ABSTRAKT 60
8. ABSTRACT 61
9. POUŽITÁ LITERATURA 62

Seznam použitých zkratek

A549	buněčná linie karcinomu plic
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidní prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
AmA	Amarylkovité alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenasa
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HDAC	histondeacetylasa
HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního čípku
HepG2	buněčná linie karcinomu jater
HL-60	buněčná linie promyelocytární leukémie
HT-29	buněčná linie kolorektálního adenokarcinomu
Hs683	buněčná linie gliomu
IC_{50}	50% inhibiční koncentrace
K562	buněčná linie chronické myeloidní leukémie
MCF-7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MOLT-4	buněčná linie lymfoblastické leukémie
N4OMT	norbelladin-4´-*O*-methyltransferasa
NF-kappa B	jaderný faktor kappa B
NMDA receptor	N-methyl-D-aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
NS	norbelladinsynthasa
OE21	buněčná linie karcinomu jícnu
PAL	fenylalanin-amoniaklyasa
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
SKMEL-28	buněčná linie maligního melanomu
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu

TDC	tyrosindekarboxylasa
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF-α	tumor nekrotizující faktor α

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1 *Narcissus* poëticus [11] a *Narcissus* pseudonarcissus [12] 13
Obrázek 2 *Narcissus* cv. Arkle [15] 14
Obrázek 3 *Narcissus* cv. Blazing Starlet [18] 15
Obrázek 4 *Narcissus* cv. Dr. Alex Fleming [21] 15
Obrázek 5 *Narcissus* cv. Heamor [23] 16
Obrázek 6 *Narcissus* cv. Isha [26] 17
Obrázek 7 *Narcissus* cv. Lorikeet [28] 17
Obrázek 8 *Narcissus* cv. Woodland Star [30] 18
Obrázek 9 Biosyntéza norbelladinu 19
Obrázek 10 Strukturní typy AmA 20
Obrázek 11 Struktura galanthaminu, rivastigminu a donepezilu 23
Obrázek 12 Struktura lykorinu 26
Obrázek 13 Struktura haemanthaminu a 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu 27
Obrázek 14 TLC vzorku AL-730 – soustava To:Et_2NH 9:1, detekce Dragendorffovým činidlem 40
Obrázek 15 TLC vzorku AL-730 – soustava To: Et_2NH 9:1, detekce pod UV 41
Obrázek 16 TLC frakcí AL-730 – soustava To:Et_2NH 9:1, detekce Dragendorffovým činidlem 42
Obrázek 17 TLC podfrakce AL-730-4-1 – soustava To:Et_2NH 9:1, detekce Dragendorffovým činidlem 43
Obrázek 18 Chromatogram sumárního extraktu AL-719 45
Obrázek 19 Chromatogram sumárního extraktu AL-721 46
Obrázek 20 Chromatogram sumárního extraktu AL-724 47
Obrázek 21 Chromatogram sumárního extraktu AL-727 48
Obrázek 22 Chromatogram sumárního extraktu AL-730 49
Obrázek 23 Chromatogram sumárního extraktu AL-733 50
Obrázek 24 Chromatogram sumárního extraktu AL-744 51
Obrázek 25 Struktura hippeastrinu 54
Obrázek 26 Struktura haemanthaminu 55
Obrázek 27 Struktura lykoraminu 56

Tabulka 1 Výtěžky extraktů 35
Tabulka 2 Hmotnosti frakcí vzorku AL-730 41
Tabulka 3 Hmotnosti podfrakcí AL-730-4 42
Tabulka 4 Hmotnosti podfrakcí AL-730-4-1 43
Tabulka 5 Přehled alkaloidů v extraktech 52
Tabulka 6 Inhibiční aktivita extraktů a referenčních látek vůči AChE a BuChE 53

1. ÚVOD

Rostliny jsou nepostradatelným zdrojem cenných látek. Už v pravěku lidé uměli využít léčivé vlastnosti rostlin. Důkazy o používání rostlin k léčení nalezneme např. v Egyptských papyrech, Čínských spisech, nebo Galénových spisech, ve kterých mimo jiné zmiňuje, že rostlina obsahuje více účinných látek. [1]

Účinek rostlin ať už léčivý nebo toxický je spjat se schopností rostlin hromadit produkty sekundárního metabolismu. Ty vznikají z produktů primárního metabolismu, jímž jsou především sacharidy, aminokyseliny, acetylkoenzym A, šikimát a mevalonová kyselina. Sekundární metabolity nalezneme ve všech vyšších rostlinách. Jejich účel je vysvětlován různými hypotézami – alelochemikálie (ochrana proti predátorům: požeračům, houbám, mikrobům, virům) nebo signální sloučeniny (lákání opylovačů, přenašečů semen). V daném taxonu se většinou vyskytuje jedna majoritní skupina chemicky příbuzných látek. [2]

Jednou z nejdůležitějších skupin látek jsou alkaloidy. Asi u 10-20 % rostlin můžeme alkaloidy nalézt. Obsahují ve své struktuře dusík a jsou zpravidla alkalické povahy. Alkaloidy vznikají většinou biosyntetickou cestou z aminokyselin. Rozdělit je můžeme podle struktury na vlastní (pravé) alkaloidy, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy. Pravé alkaloidy mají dusík vázán heterocyklicky, přičemž dusík pochází z prekurzorové aminokyseliny. Potoalkaloidy vznikají také z aminokyseliny, ale dusík nemají heterocyklicky vázaný. Pseudoalkaloidy obsahují sice dusík z aminokyseliny, ale jejich biosyntéza z ní nevychází. Alkaloidy jsou v rostlinách uloženy ve formě solí s organickými kyselinami. Tyto ve vodě rozpustné soli umožňují izolaci alkaloidů během extrakce s různě polárními rozpouštědly při různém pH. Kromě hlavního alkaloidu se v rostlině vyskytují i vedlejší alkaloidy, které mají stejnou základní strukturu, ale liší se substituenty, počtem a polohou násobných vazeb nebo počtem a polohou hydroxylových či jiných skupin. Obsah a složení alkaloidů je dále různý v závislosti na ontogenezi rostliny, typu orgánu a růstových podmínkách rostliny. Růstovými podmínkami se rozumí podnebí, prostředí, složení půdy a živiny, které rostlina přijímá. [3]

Alkaloidy mají velmi rozdílné účinky vzhledem k velmi rozdílné chemické struktuře. Lokálně anestetickým účinkem se vyznačuje kokain. Analgetický, případně narkotický účinek má morfin. V terapii se pro svůj antitusický účinek používá kodein. Na úpravu srdečního rytmu působí chinidin, ajmalin či spartein. Uterotonický účinek mají námelové alkaloidy,

konkrétně ergometrin. V očním lékařství našel uplatnění atropin. Toxickým účinkem se vyznačují alkaloidy akonitin nebo strychnin. [3]

Kromě alkaloidů jsou toxické i další látky nealkaloidní povahy, např. z kyanogenních glykosidů hydrolýzou vzniká jedovatý kyanovodík. Bílkovinný toxin ricin je obsažen v semenech *Ricinus communis*. [3] Je však důležité si uvědomit, že i jedovaté rostliny jsou zdrojem léčivých látek a že rozmezí mezi terapeutickou a toxickou dávkou je velmi malé [4]. Digoxin jako zástupce kardioaktivních glykosidů se získává z jedovaté rostliny *Digitalis lanata* a má své uplatnění v léčbě srdečních chorob. Naopak můžeme zmínit jedovatý thujon přítomný v léčivé rostlině *Salvia officinalis*, která se využívá pro své antiseptické vlastnosti. [3]

I když se v dnešní době do klinické praxe častěji dostávají látky vyrobené chemickou cestou, část nových léčiv je odvozena od látek, které se přirozeně vyskytují v rostlinách [5]. Současné studie se zabývají i přípravky tradiční medicíny jižní a východní Asie, Afriky a Střední a Jižní Ameriky a cílem je ověřit jejich účinky pomocí moderních metod [2]. V místě svého přirozeného výskytu jsou tyto přípravky v terapii běžně používány a výsledky jsou spojeny i s klinickými studiemi. Zato v Evropě jsou rostlinné přípravky obsaženy spíše v doplňcích stravy nebo jsou využívána jako podpůrná léčiva. [2, 5]

2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je:

- Zpracování rešerše zaměřené na problematiku zadaných taxonomických jednotek (kultivarů) rodu *Narcissus* sp. z čeledi Amaryllidaceae
- Příprava 7 sumárních alkaloidních extraktů z kultivarů rostlin rodu *Narcissus*
- GC-MS analýza sumárních alkaloidních extraktů a její vyhodnocení
- Stanovení inhibiční aktivity sumárních alkaloidních extraktů vůči acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE)
- Izolace alkaloidů z alkaloidního extraktu AL-730 pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie (TLC)
- Shrnutí výsledků
- Sepsání diplomové práce

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Čeleď Amaryllidaceae

Rostliny z čeledi Amarylkovitých jsou krytosemenné vytrvalé byliny. Rostou hlavně v subtropech a tropech, převážně ve střední a jižní Evropě a v jižní Americe i Africe. Čeleď Amaryllidaceae obsahuje 65 rodů a 1000 druhů rostlin. V České republice se vyskytují druhy *Narcissus* (narcis), *Galanthus* (sněženka) a *Leucojum* (bledule). Z dalších rodů můžeme jmenovat např. *Crinum* (křín), *Amaryllis* (amarylka), *Clivia* (klívie). [2, 3, 6]

Tyto suchozemské byliny mají podzemní cibuli, oddenky nebo hlízy. Stonek je většinou bezlistý. Listy těchto bylin jsou čárkovité, a to přízemní nebo lodyžní. Květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem. Mohou být jednotlivé nebo jsou uspořádány do šroubelovitého květenství. Někdy je přítomna pakorunka. Plodem je tobolka nebo bobule. [2, 7]

Zástupci čeledi Amaryllidaceae byly využívány již v tradiční medicíně. Např. antičtí Řekové jej využívali k léčbě rakoviny, ostatní národy z Afriky, Asie a Polynésie k léčbě různých nemocí. [8] Dnes se často pěstují jako okrasné květiny, ale rostou i volně v přírodě. Jsou také významným zdrojem cenných látek – alkaloidů. [2]

3.1.1. Rod *Narcissus*

Taxonomie tohoto druhu je složitá kvůli výskytu rozmanité populace narcisů, snadnému přirozenému křížení divokých druhů, kultivaci, šlechtění a hybridizaci [9]. Narcisy rostly už v antických zahradách, ale v 16. stol. se na rozvoji pěstování a kultivaci narcisů nejvíce podílel slavný holandský botanik Charles de L´Écluse, též známý jako Carolus Clusius. Šlechtění a hybridizace narcisů byla v Evropě významná v druhé polovině 19. stol a přinesla tisíce kultivarů. Většina cibulí byla dovezena ze Španělska. [7, 10]

Obrázek 1 *Narcissus poëticus* [11] a *Narcissus pseudonarcissus* [12]

Narcisy rostou různorodě. Nalezneme je v nížinách, ale i v horských oblastech, na sušších místech i podél řek jihozápadní Evropy [4, 9]. Narcisy stejně jako další druhy čeledi Amaryllidaceae rostou brzy na jaře [9]. *Narcissus poëticus* (narcis bílý) a *Narcissus pseudonarcissus* (narcis žlutý) rostou volně v jihozápadní Evropě. Okrasně jsou pěstovány ve střední Evropě v zahradách i ve sklenících. Nalézt je můžeme na slunných až polostinných místech s propustnou písčitohlinitou půdou, která má dostatečnou vláhu na jaře a na podzim. [4, 7]

Narcis je 20-50 cm vysoká bylina. Z cibule vyrůstají přímo až šikmo vzhůru 2-4 čárkovité až páskovité listy a bezlistá lodyha. Lodyhu zdobí obvykle jeden květ uvnitř s pakorunkou, která má často odlišnou barvu od okvětí. Okvětí u *N. poëticus* je typicky bílé, u *N. pseudonarcissus* žluté. U kultivarů má okvětí různé odstíny žluté, oranžové, růžové až červené a objevují se i barevné kombinace. Okvětních lístků je většinou 6, ale u některých kultivarů mohou být i zmnožené. Pakorunka je hlavní odlišností od ostatních rodů čeledi Amaryllidaceae a může být různé velikosti i tvaru – malá, úzká, plochá, dlouhá, miskovitá, válcovitá, nálevkovitá nebo kalichovitá. Její okraj je hladký, vroubkovaný, zvlněný až laločnatý. Plodem je kulovitá nebo elipsoidní tobolka. Přestože je celá rostlina jedovatá, je *Narcissus poëticus* i *Narcissus pseudonarcissus* oblíbenou okrasnou rostlinou. [4, 7]

3.1.2. Kultivary narcisů použité v experimentální části

Narcissus pseudonarcissus byl předlouhou mnoha komerčních kultivarů, a to hlavně trubkovitých narcisů. Kultivary jsou v porovnání s původním divokým druhem většinou větší a robustnější. [13] K vytvoření nádherných květů byly kříženy velké zahradní kultivary s malými divokými druhy. Kington popsal 13 divizí zahradních kultivarů narcisů a od roku

1998 je The International Daffodil Register and Classifield List každoročně aktualizován a doplněn o nové kultivary narcisů. [9] V rámci této diplomové práce bylo využito 7 kultivarů narcisů, které byly zakoupeny od firmy Lukon Glads se sídlem v Lysé nad Labem.

3.1.2.1. *Narcissus* cv. Arkle

Kultivar Arkle je vysoký a patří mezi trubkovité narcisy. Jak naznačuje název, jejich trubka (pakorunka) je dlouhá, někdy delší než okvětní lístky. Tento kultivar se vyznačuje velkými zlatě žlutými květy. Okvětní lístky jsou široce vejčité, tupě zakončené a překrývají se z jedné třetiny až poloviny. Jsou ohnuté, ploché nebo vypouklé. Pakorunka je válcovitá, mírně se rozšiřuje a její okraj je vroubkovaný. [13, 14]

Autorem hybridizace kultivaru Arkle je J. Lionel Richardson z Irska. Arkle vznikl hybridizací kultivarů *Narcissus* cv. Yellow Idol a *Nasrcissus* cv. Golden Clarion. Registrace kultivaru Arkle proběhla v roce 1968. [14]

Obrázek 2 *Narcissus* cv. Arkle [15]

3.1.2.2. *Narcissus* cv. Blazing *S*tarlet

Kultivar Blazing Starlet je řazen mezi orchideokvěté narcisy neboli koláry. Pakorunka těchto narcisů je rozštěpená na několik částí. Je zvlněná a její okraj je výrazně nařasený. Kultivar Blazing Starlet má světle zelenožluté okvětní lístky vejčitého tvaru, na konci zašpičatělé. Bílá až světle žlutá pakorunka je lemována žlutooranžovým okrajem. Tvar pakorunky je miskovitě plochý. Květy směřují vzhůru v celkové výšce 40 cm. [13, 16, 17]

N. cv. Blazing Starlet vypěstoval v Nizozemsku J. Gerritsen a syn. Registrace kultivaru proběhla v roce 2009. [16]

Obrázek 3 *Narcissus* cv. Blazing Starlet [18]

3.1.2.3. *Narcissus* cv. Dr. Alex Fleming

Tento 40-50 cm vysoký narcis patří mezi velkokorunné narcisy, jejichž korunky mají tvar trubek, kalíšků, pohárků nebo podšálků. Pakorunky jsou kratší než okvětní lístky. Kultivar Dr. Alex Fleming může mít na stonku i 2 zaoblené květy. Bílé okvětní lístky jsou velmi široké, trochu prohnuté a vzájemně se překrývají až z jedné poloviny. Sytě oranžová miskovitá pakorunka je silně řasená a její okraj je vroubkovaný. [19, 20]

Kultivar Dr. Alex Fleming byl registrován před rokem 1948. V Nizozemsku ho vypěstovala společnost J. W. A. Lefeber. [19]

Obrázek 4 *Narcissus* cv. Dr. Alex Fleming [21]

3.1.2.4. *Narcissus* cv. Heamor

Tato plnokvětá odrůda má zaoblený květ. Zářivě žluté okvětní lístky jsou ve 3 přeslenech, jsou široce vejčité a překryté z jedné poloviny. Okvětní lístky jsou ploché, směrem do středu více ohnuté a okraje stočené. Typická pakorunka chybí, její části jsou roztroušeny mezi okvětními lístky. Jsou o jednu třetinu kratší než okvětní lístky, jsou tmavšího tónu a jsou více řasené. [22]

Registrace kultivaru Heamor byla provedena v roce 1996. Ron A. Scamp vytvořil tento kultivar v Anglii. Je výsledkem hybridizace kultivarů *Narcissus* cv. Saint Keverne a *Narcissus* cv. Tamar Fire. [22]

Obrázek 5 *Narcissus* cv. Heamor [23]

3.1.2.5. *Narcissus* cv. Isha

Narcisy kultivaru Isha patří mezi plnokvěté narcisy, které mají zmnožené okvětní lístky. Mají silné stonky, které jsou velice odolné proti ohýbání. Okvětí je tvořeno širokými jasně žlutými lístky, pakorunka, resp. její části jsou sytě oranžové. [24, 25]

V Nizozemsku ho vypěstoval Th. van der Hulst. Vznikl hybridizací kultivarů *Narcissus* cv. Extol a *Narcissus* cv. Ascot. V roce 2000 byl kultivar registrován. [24]

Obrázek 6 *Narcissus* cv. Isha [26]

3.1.2.6. *Narcissus* cv. Lorikeet

Tento větší kultivar pochází z USA a je řazen mezi trubkovité narcisy. Květy mají v průměru až 10 cm. Okvětní lístky jsou jemně citrónově žluté. Uprostřed je dlouhá pakorunka meruňkově růžové barvy, která se ke konci výrazně rozšiřuje do tvaru zvonu a je na okraji zoubkovaná. [27]

Autorem hybridizace je Grant E. Mitsch z Oregonu v USA. K hybridizaci byl použit *Narcissus* cv. Rima. Kultivar Lorikeet byl registrován v roce 1979. [27]

Obrázek 7 *Narcissus* cv. Lorikeet [28]

3.1.2.7. *Narcissus* cv. Woodland *S*tar

Kultivar Woodland Star patří do skupiny malokorunných narcisů. Květy jsou celkově symetrické, pakorunka je dlouhá maximálně jako třetina délky okvětních lístků. Kultivar

Woodland Star má čistě bílé okvětní lístky, které jsou vejčité a na okraji mírně zaoblené. Miskovitá pakorunka je sytě oranžová až červená a její lem je zvlněný. [29]

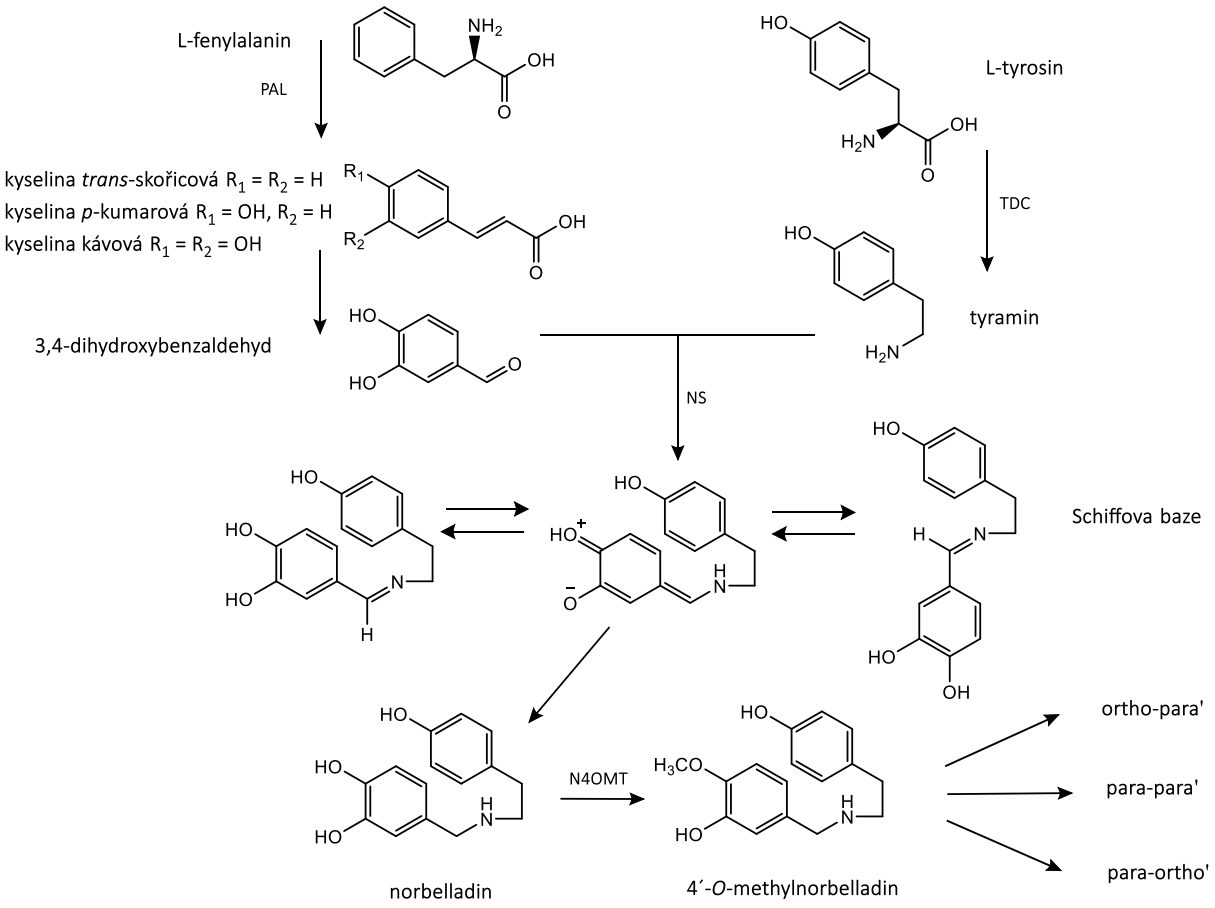
Registrace kultivaru proběhla v roce 1962. Vytvořil ho Tom Bloomer v Severním Irsku z kultivarů *Narcissus* cv. Bravura a *Narcissus* cv. Glenwherry. [29]

Obrázek 8 *Narcissus* cv. Woodland Star [30]

3.1.3. Amaryllidaceae alkaloidy

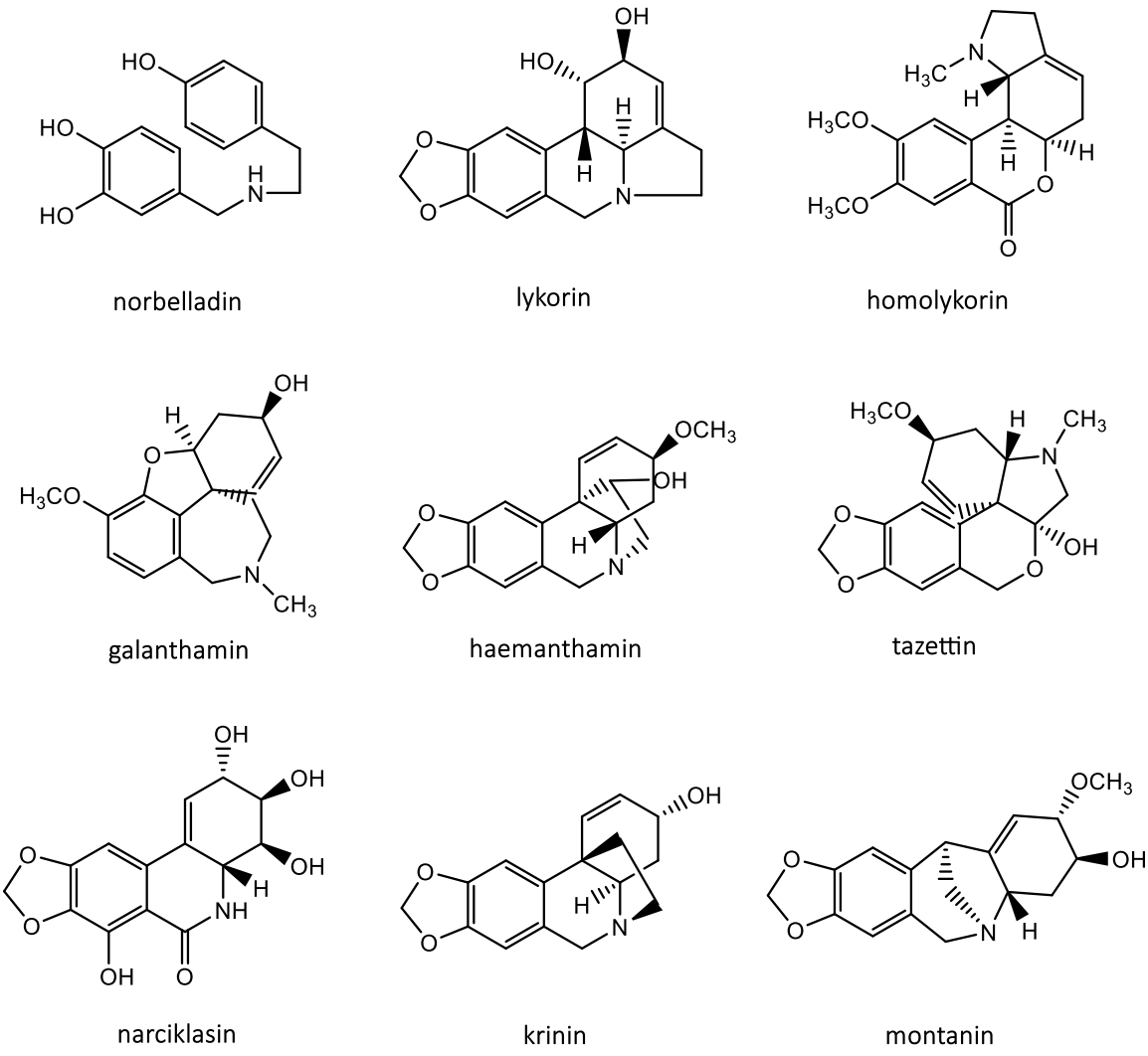
Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou důležitým fytochemickým zdrojem, ze kterého bylo izolováno a strukturně popsáno 500 alkaloidů. V roce 1877 byl jako první z této skupiny alkaloidů izolován lykorin a to z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*. [6, 9] Amarylkovité alkaloidy (AmA) mají strukturu isochinolinových alkaloidů. Rod *Narcissus* obsahuje přes 100 alkaloidů. Alkaloidy nalezneme v celé rostlině, ale nejvíce jsou zastoupeny v cibulích. [9]

Syntéza alkaloidů probíhá zřejmě v nadzemní části rostliny a po oplodnění jsou alkaloidy transportovány do cibule [9]. Amarylkovité alkaloidy vznikají Norbelladinovou cestou. Biosyntéza vychází ze dvou aromatických aminokyselin – L-tyrosinu a L-fenylalaninu. L-tyrosin je tyrosindekarboxylasou (TDC) dekarboxylován na tyramin [31]. L-fenylalanin je enzymem fenylalanin-amoniaklyasou (PAL) přeměňován na kyselinu *trans*-skořicovou a dále se několika reakčními kroky mění na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Kondenzaci tohoto aldehydu a tyraminu katalyzuje norbelladinsynthasa (NS) a vzniká Schiffova baze a z ní pak hlavní prekurzor AmA norbelladin. [6, 9, 31] Schéma vzniku norbelladinu můžeme vidět na **Obr. 9**.



Obrázek 9 Biosyntéza norbelladinu

Methylací norbelladinu za katalytického působení norbelladin-4´-*O*-methyltransferasy (N4OMT) vzniká 4´-*O*-methylnorbelladin, který je výchozí sloučeninou dalších typů AmA [31]. Vznikají oxidativním spojováním 4´-*O*-methylnorbelladinu, a to ortho-para', para-para' nebo para-ortho'. Výsledkem biosyntetické cesty je 9 základních strukturních typů AmA – norbelladinový, lykorinový, homolykorinový, galanthaminový, haemanthaminový, tazettinový, narciklasinový, krininový a montaninový. [6, 9]



Obrázek 10 Strukturní typy AmA

AmA mohou být významně toxické. Toxicita rostliny *Narcissus poëticus* se může objevit při záměně cibule za cibuli kuchyňskou. Otrava se projevuje salivací, zvracením a průjmem. Vyšší dávka lykorinu může vyvolat paralýzu, jaterní poškození a kolaps. [4]

AmA jsou nepostradatelné pro přežití rostlin, např. mohou být ochranou před napadením hmyzem. Mají mnoho zajímavých fyziologických účinků, které se dají využít, nebo se již využívají v klinické praxi. Dostupnost těchto alkaloidů je nedostatečná, protože se izolují z přírodních zdrojů, a to jen v malém množství. To vedlo k vývoji syntéz těchto alkaloidů nebo k přípravě jejich polosyntetických derivátů, které by mohly být využity jako potenciální léčiva. [9]

3.2. Biologická aktivita

Biologická a farmakologická aktivita AmA je značná a v poslední době se výzkumu aktivit či samotným alkaloidům věnuje více a více pozornosti.

3.2.1. Inhibice cholinesteras

Cholinesterasy jsou enzymy, které rozkládají acetylcholin (Ach) na cholin a kyselinu octovou na synapsích cholinergních neuronů, nervosvalových spojeních a v cílových orgánech parasympatiku. Ach je degradován v mozku spíše acetylcholinesterasou (AChE), než butyrylcholinesterasou (BuChE). Inhibicí AChE dochází ke zvýšení množství Ach, zvýšení stimulace nikotinových i muskarinových receptorů a k posílení neurotransmise. [32, 33]

Galanthamin je nejznámějším inhibitorem AChE. Má 53x vyšší selektivitu k AChE než k BuChE. Galanthamin je tedy selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor AChE, který působí dlouhodobě. Prochází hematoencefalickou bariérou a může tak působit v centrálním nervovém systému (CNS). Dále je schopen alostericky modulovat nikotinové receptory a tím zvyšuje jejich citlivost k Ach. [6, 32]

Sanguinin je dalším alkaloidem z čeledi Amaryllidaceae, který vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE. Je účinnějším inhibitorem AChE než galanthamin. Má jednu hydroxylovou skupinu navíc, kterou může interagovat s AChE, nicméně tato hydroxylová skupina způsobuje, že je sanguinin hydrofilnější a znesnadňuje průnik hematoencefalickou bariérou. V mozku je jeho biologická dostupnost nižší než u galanthaminu. [9, 34]

Inhibiční aktivitu vůči AChE mají i assoanin a oxoassoanin. Jejich inhibiční aktivita je vyšší v porovnání s ostatními alkaloidy lykorinového typu. Samotný lykorin se vyznačuje jen patrnou inhibiční aktivitou proti AChE. [9, 32]

3.2.1.1 Klinické využití inhibice cholinesteras

V klinické praxi se využívají inhibitory cholinesteras k léčbě mírných až středních forem Alzheimerovy choroby (AD). V první řadě se terapie zakládá na zvýšení koncentrace acetylcholinu v cílových strukturách CNS, protože deficit cholinergní transmise je důležitým faktorem AD. [5, 35] Samotný Ach není v praxi využitelný, protože je již na periferii velmi rychle rozkládán cholinesterasami. Proto našly uplatnění inhibitory AChE, které jsou schopny dostat se do cílových struktur CNS. Inhibicí AChE se zvyšuje množství Ach na cholinergních synapsích a zlepšují se kognitivní funkce u pacientů s AD. [5] Inhibice BuChE je také žádoucí

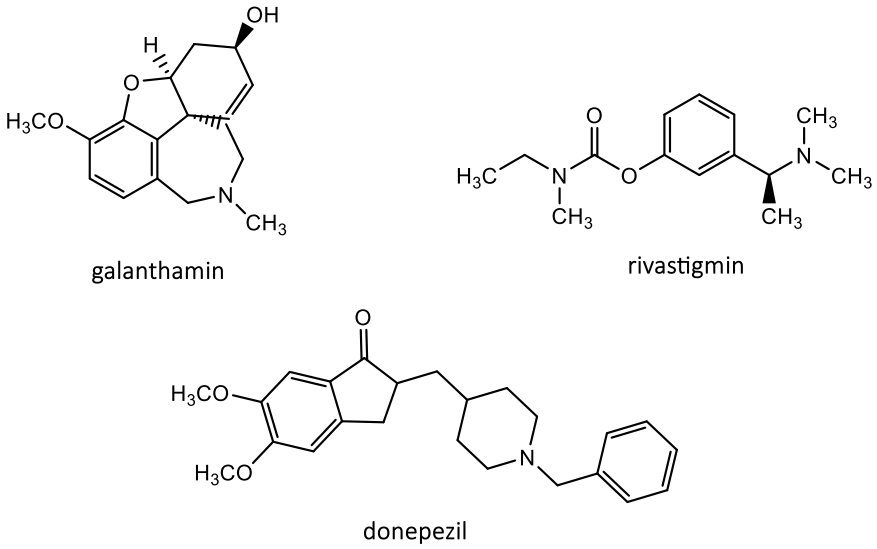
pro zvýšení množství Ach, protože u pacientů s AD je BuChE přítomna ve větším množství [33].

K terapii AD se používají 3 látky ze skupiny inhibitorů AChE – galanthamin, donepezil a rivastigmin. Účinek galanthaminu byl popsán výše. Galanthamin se užívá ve formě tablet s prodlouženým uvolňováním 1x denně a dávka galanthaminu se postupně titruje. Počáteční dávka je 8 mg/den, dávka se při dobré snášenlivosti zvyšuje na 16 mg/den a 24 mg/den po čtyřtýdenních intervalech. I když je dobře snášen, může vyvolat bradykardii a gastrointestinální nežádoucí účinky. [33, 36]

Donepezil je derivát piperidinu. Je reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE. Inhibice BuChE je klinicky nevýznamná. Má schopnost aktivovat specifické nikotinové receptory a chránit neurony proti toxicitě glutamátu. Aktivuje i muskarinové receptory (M5) ve stěnách mozkových cév a tím zlepšuje mikrocirkulaci. Jeho biologický poločas je 70 hodin, takže se podává jen 1x denně. Zahajovací dávka je 5 mg/den, ta se dá po 4-8 týdnech zvýšit na 10 mg/den. [33, 36]

Rivastigmin patří strukturálně mezi karbamáty. Inhibuje AChE i BuChE. Rivastigmin se v perorální formě podává 2x denně. Na začátku se podává 2x denně 1,5 mg a po 4 týdnech se vždy dávka zvyšuje o 1,5 mg až na konečných 6 mg, které se podávají 2x denně. Rivastigmin při perorálním podání může vyvolat gastrointestinální nežádoucí účinky. Ve formě náplastí jsou tyto nežádoucí účinky eliminovány. Náplast se lepí 1x denně a začíná se s dávkou 4,6 mg/den. Po 4-8 týdnech se dávka navyšuje na 9,5 mg/den. [33, 36]

Tyto léčiva AD nemohou vyléčit, ale zpomalí její progresi. Proto je potřeba léčbu inhibitory cholinesteras zahájit co nejdříve. Užíváním inhibitorů cholinesteras se oddálí nástup těžkých stádií nemoci, zlepší se kognitivní symptomy a zlepší se i kvalita života nemocného, případně i ošetřovatele. [33, 35]



Obrázek 11 Struktura galanthaminu, rivastigminu a donepezilu

3.2.1.2. Alzheimerova choroba

Tato kapitola se více zaměřuje na problematiku Alzheimerovy choroby. AD je neurodegenerativní onemocnění, které je nejčastější příčinou demence. Objevuje se u pacientů starších 65 let a incidence s věkem narůstá. Onemocnění rychle progreduje a postupně narušuje kognitivní funkce. Mezi první příznaky patří ztráta krátkodobé paměti. Jak nemoc postupuje, objevují se další symptomy jako ztráta dlouhodobé paměti, zmatenost, problémy s řečí (zadrhávání a problém s pojmenováním), změny nálad a úsudku, problémy s běžnými denními aktivitami. Pacient se časem zhoršuje a je odkázán na pomoc rodiny či pečovatele. [35, 37, 38]

Neznáme přesnou příčinu vzniku AD, ale existuje několik faktorů, které vedou k zániku neuronů. Charakteristickým patologickým znakem AD je přítomnost amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek. Tyto změny se objevují především ve frontálním laloku, hipokampu a mozkové kůře. [35]

Amyloidní plaky jsou tvořeny β-amyloidními peptidy, které vznikají enzymatickým štěpením amyloidního prekurzorového proteinu (APP). APP je za normálních podmínek štěpen α-sekretasou, za patologických podmínek je štěpen β-sekretasou a γ-sekretasou za vzniku β-amyloidních peptidů. β-amyloidní peptidy jsou delšími fragmenty štěpení, jsou hydrofobní a mají vyšší tendenci se shlukovat v amyloidní plak. V oblastech výskytu β-amyloidu dochází k odumírání neuronů. [35, 37, 39] β-amyloidní peptidy jsou schopny

navázat se na receptory na povrchu buněk, např. na receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) a scavenger receptor. V mikrogliových buňkách aktivací scavenger receptorů a RAGE vzniká zánět, který způsobuje neurotoxicitu. Vznikají volné kyslíkové radikály, které depolarizují buněčnou membránu a aktivují NMDA receptory. Aktivací NMDA receptorů se zvyšuje intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Ca^{2+} a kyslíkové radikály poškozují neurony a mohou vyvolat buněčnou smrt. [40]

Neurofibrilární klubka jsou tvořeny shluky hyperfosforylovaného proteinu tau. Fyziologická role proteinu tau spočívá v regulaci růstu axonu a axonálního transportu. Dále se podílí na stabilitě mikrotubulů a cytoskeletu neuronu. Ve zdravém mozku je proces fosforylace proteinu tau dynamicky regulován pomocí taukinas a taufosfatas. Nerovnováha mezi kinasami a fosfatasami vyskytující se u nemocných s AD způsobuje, že hladina fosforylace tau proteinu je 3-4x vyšší, než za normálních podmínek. Nadměrná fosforylace vyvolává nižší afinitu proteinu tau k vazbě na mikrotubuly a jeho agregaci v neurofibrilární klubka. Ty narušují stabilitu cytoskeletu a přispívají ke smrti neuronů. [35, 37, 41]

Nejvíce zasaženými neurony u AD jsou cholinergní neurony lokalizované v nucleus basalis Meynerti. Zdravý člověk má přibližně 500 000 cholinergních neuronů v nucleus basalis, pacient s pokročilou AD jich má přibližně 100 000. Progrese nemoci je navíc ovlivněna sníženou transkripcí cholinacetyltransferasy (enzym syntetizující Ach) ve zbývajících cholinergních neuronech. Kromě degradační funkce AChE, jak bylo zmíněno výše, je tento enzym také zapojen do patologie AD. AChE podporuje tvorbu amyloidních plaků tím, že interaguje s β-amyloidním peptidem, jak ukázala studie molekulárního modelování. Cholinergní změny, které souvisí s kognitivním deficitem u pacientů, jsou cílem terapie AD. [35]

Základem farmakoterapie jsou inhibitory AChE, které byly popisovány v předešlé kapitole. V druhé řadě se v klinické praxi využívá ještě memantin, který blokuje NMDA receptory a snižuje tak nadměrnou glutamátergní neurotransmisi. Je indikován pro středně závažné až těžké stádium AD. [5] Memantin je obecně dobře tolerován, vzácně se mohou vyskytnout bolesti hlavy, závratě, halucinace či nadměrná excitace nebo útlum. Zahajovací dávka je 5 mg/den. V týdenních intervalech se dávka navyšuje vždy o 5 mg na konečných 20 mg/den. Užívá se v jedné nebo ve dvou denních dávkách. V některých případech může pacient profitovat i z kombinace inhibitorů cholinesteras a memantinu. [36]

Kromě farmakoterapie je třeba se zaměřit i na další aspekty léčby. Je potřeba každého pacienta posuzovat individuálně. Nemělo by se zapomenout na celkový stav nemocného. Důležitá je správná výživa včetně hydratace a tělesná aktivita. Je potřeba léčit i další onemocnění a při tom se vyhnout podávání léčiv s anticholinergní aktivitou, proto by byla vhodná spolupráce s dalšími lékaři. Pacient by měl mít někoho, kdo bude mít léčbu na starost, ideálně rodinného příslušníka. Ten by měl mít přehled o užívané medikaci a v případě lékařské prohlídky o ní informovat lékaře. Dále by měl dohlížet na řešení právních a sociálních problémů (příspěvek na péči, omezení svéprávnosti). V mírných a středních stádiích nemoci by měl pacient pokračovat ve svých běžných aktivitách. Měla by se provádět kognitivní rehabilitace. Doporučuje se i skupinová aktivita, aby měl nemocný kontakt s ostatními členy skupiny. V těžkých stádiích nemoci se doporučuje individuální aktivita, kde je kladen důraz na nonverbální techniky a senzorickou stimulaci. V konečném stadiu AD se volí paliativní přístup. [36]

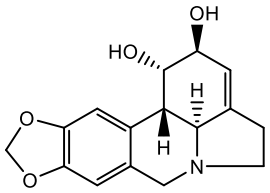
V průběhu nemoci se mohou objevit behaviorální problémy, které je potřeba řešit. Příčinou těchto problémů je, že pacient není schopen správně verbalizovat své potíže nebo požadavky. Pro příklad má strach ze samoty, něco ho bolí nebo neporozuměl situaci. K těmto změnám dochází vlivem kognitivního deficitu. Jinou příčinou behaviorálních problémů může být rozvoj úzkosti či deprese, které jsou často způsobeny nedostatkem serotoninu. K zvládnutí těchto stavů se používají antidepresiva ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) nebo trazodon. [36]

3.2.2. Protinádorová a cytotoxická aktivita

Významná je i protinádorová aktivita. Amarylkovité alkaloidy jsou vysoce selektivní k nádorovým buňkám a mají relativně nízkou toxicitu k zdravým buňkám nebo k buňkám klidovým. Jsou schopny indukovat apoptózu v různých typech rakovinných buněk a mají silné antiproliferativní účinky. [6, 32]

Lykorin i jeho polosyntetické deriváty byly zkoupány u několika typů rakovinných buněk. Studie probíhaly *in vitro* i *in vivo*. Lykorin je účinný ve velmi nízké koncentraci, a navíc má nízkou toxicitu. Lykorin je silným induktorem apoptózy. Může ji vyvolat prostřednictvím mitochondrií nebo receptorů smrti v rakovinných buňkách. Jeho účinek byl sledován u rakoviny prsu, močového měchýře, leukémie a myelomu. Lykorin je schopný zastavit buněčný cyklus ve fázi G0/G1 nebo G2/M, a to dle typu rakoviny. Struktura lykorinu je

důležitým ukazatelem cytotoxické aktivity. Volné hydroxylové skupiny na C-1 a C-2 jsou nezbytné pro protinádorovou aktivitu. Disubstitucí těchto hydroxylových skupin se snižuje cytotoxický účinek. Další podmínkou je bazický dusík, protože nebazický charakter dusíku způsobil ztrátu protinádorové aktivity. [42]



Obrázek 12 Struktura lykorinu

Ve studii zaměřené na buněčnou linii promyelocytární leukémie HL-60 vykazoval lykorin protinádorovou aktivitu v rozmezí koncentrací 0,31-5 µM. Buněčná linie HL-60 se široce používá jako model leukemických buněk ke studiu buněčných a molekulárních dějů. Proliferace buněk byla při 1,25 µM koncentraci lykorinu významně snížena. V závislosti na dávce lykorin snížil počet kolonií v polotuhé kultuře, takže by mohl snižovat malignitu a regenerační potenciál nádorových buněk. Pomocí průtokové cytometrie byla provedena analýza buněčného cyklu a bylo zjištěno, že lykorin je schopen zastavit buněčný cyklus ve fázi G2/M při 5 µM koncentraci. Zatímco při 1,25 µM koncentraci nebyla pozorována žádná fragmentace DNA, při 2,5 nebo 5 µM koncentraci byly pozorovány typické fragmenty DNA, které jsou znakem apoptózy buněk. Ukázalo se, že lykorin může indukovat apoptózu leukemických buněk. Apoptóza je indukována pomocí aktivity kaspas. Při 5 µM koncentraci lykorinu se zvýšila aktivita kaspasy 8, kaspasy 9 a kaspasy 3, přičemž aktivita kaspasy 3 byla nejvíce zvýšena. Na apoptóze, resp. životě buněk se podílejí i proteiny Bcl-2. Při podání lykorinu se hladiny Bcl-2 proteinů snížily, což v konečném důsledku vedlo k aktivaci kaspas a apoptóze leukemických buněk. [32, 42, 43]

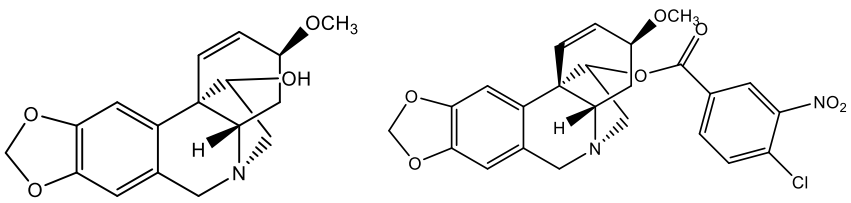
Další *in vitro* studie ukázala účinky lykorinu na buněčné linie chronické myeloidní leukémie K562. Buňky K562 byly vystaveny 1,25, 2,5 a 5 µM koncentraci lykorinu a ukázalo se, že lykorin snižuje proliferaci buněk v závislosti na dávce. Dále bylo zjištěno, že lykorin neovlivňuje expresi histondeacetylasy (HDAC) v buňkách K562, ale inhibuje přímo aktivitu HDAC. HDAC je enzym, který deacetyluje histony. Deacetylace a acetylace histonů se podílí

na regulaci struktury chromatinu a transkripci genu. Tyto děje jsou důležité při růstu buněk, diferenciaci a apoptóze. Inhibicí HDAC se zastavuje buněčný cyklus a indukuje se apoptóza. Buněčný cyklus byl zastaven po přidání 5 µM lykorinu ve fázi G0/G1, jak bylo odhaleno pomocí průtokové cytometrie. [32, 44]

Pseudolykorin v kombinaci s merkaptopurinem nebo cyklofosfamidem zvýšil účinnost těchto cytostatik u leukemických myší infikovaných Rauscherovým virem oproti samostatnému podávání těchto léčiv. Navíc nebyl u myší pozorován negativní účinek na produkci humorálních protilátek jako u zmíněných léčiv. [32]

Haemanthamin *in vitro* se vyznačuje cytotoxickou aktivitou proti několika typům rakovinných buněčných linií, např. MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), HepG2 (karcinom jater), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF7 (adenokarcinom prsu), K562, A549 (karcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom). Dále je schopen u akutní leukémie T-buněk (buněčná linie Jurkat) indukovat apoptózu buněk aktivací kaspas, snížením potenciálu mitochondriální membrány a zastavit buněčný cyklus ve fázi G1 a G2/M. Předpokladem pro mechanismus účinku je inhibice syntézy proteinů pro tvorbu peptidové vazby na 60S podjednotce ribozomu. [32, 45]

S cílem zvýšit cytotoxický účinek, bylo z haemanthaminu připraveno několik polosyntetických derivátů. Byly připraveny estery substitucí hydroxylové skupiny na C-11 za použití alifatických nebo různě substituovaných benzoylchloridů. Při koncentraci 10 µM vykazoval derivát 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthamin výraznější antiproliferativní aktivitu vůči rakovinným buňkám než haemanthamin. Antiproliferativní účinky byly testovány na buněčných linií Jukart, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1 (epiteloidní karcinom pankreatu), A2780 (karcinom ovarií), HeLa, MCF-7, SAOS-2 (osteosarkom). Inhibice růstu buněk zmíněného derivátu se projevila i u buněčné linie MRC-5 (normální plicní fibroblasty), takže derivát nevykazuje selektivitu jen k rakovinným buňkám. [45]



Obrázek 13 Struktura haemanthaminu a 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu

Dalším alkaloidem, u kterého *in vitro* studie popsaly cytotoxické účinky je **haemanthidin**. Má účinek proti rakovinným buňkám A549, OE21 (karcinom jícnu), Hs683 (gliom) a SKMEL-28 (maligní melanom). Svými biologickými účinky je podobný účinkům haemanthaminu, protože také inhiboval proliferaci buněk, indukoval apoptózu pomocí aktivace kaspas, snížil mitochondriální potenciál a zastavil buněčný cyklus. [32]

Amarbellisin, alkaloid lykorinového typu, vykazuje silný cytotoxický účinek proti rakovinným buňkám A549, OE21, Hs683, U373 (glioblastom), SKMEL-28 a B16F10 (myší melanom), a to v koncentračním rozmezí 5-10 µM. [32]

Ungeremin má na základě studií inhibiční účinky na růst a cytotoxické účinky proti Ehrlichovu ascites karcinomu, ascites hepatomu, Lewisovu plicnímu karcinomu a Yoshidovu ascites sarkomu u myší nebo potkanů. Ungeremin může interferovat s lidskými topoizomerasami, které se účastní buněčných procesů jako je replikace, transkripce a rekombinace. Cílení na DNA maligních buněk je další zaměření vývoje nových léčiv pro léčbu rakoviny. Protinádorový účinek ungereminu byl pozorován u leukemických buněčných linií HL-60, MOLT-4, K562 a U937 (myeloidní leukémie) s průměrnou hodnotou inhibice růstu IC_{50} 1,3 µM. Maximální deplece bylo dosaženo při koncentraci 200 µM ungereminu a při vyšších koncentracích byl účinek nižší. [32]

Pretazettin se vyznačuje protinádorovými, ale i antivirovými účinky. Dle studie má cytotoxický účinek proti fibroblastickým buněčným liniím LMTK. Dále inhibuje buněčný růst buněk HeLa a je účinný proti Rauscherově leukémii, Ehrlichovu ascites karcinomu, spontánní AKR lymfoblastické leukémii a Lewisově karcinomu plic. Alkaloid má vysokou aktivitu proti buňkám akutní lymfoblastické leukémie MOLT-4. Je pravděpodobné, že pretazettin *in vitro* inhibuje P-glykoprotein v koncentraci 400 µM. P-glykoprotein je nadměrně exprimován v nádorových buňkách, zapříčiňuje eflux léčiva ven z buňky a tím přispívá k rezistenci podaných léčiv. V rozvoji protinádorových léčiv je toto důležitým ukazatelem. [32]

Protinádorový účinek **narciklasinu** byl popsán hlavně u mozkových nádorů. Inhibice růstu buněk, který narciklasin způsobuje, souvisí se schopností inhibovat syntézu proteinů. Narciklasin se váže na 60S podjednotku ribozomu a znemožňuje tvorbu peptidové vazby. Narciklasin je schopen pronikat do mozku díky svým lipofilním vlastnostem a působit zde cytotoxicky proti mozkovým nádorům, gliomům a mozkovým metastázám. Narciklasin je schopen snížit proliferaci a migraci rakovinných buněk ve velmi nízkých koncentracích (méně

než 1 μM). U glioblastomu U373, Hs683 a GL19 narušuje narciklasin proliferaci buněk snížením rychlosti mitózy. [32]

Narciklasin je induktorem apoptózy v buňkách rakoviny prostaty (PC-3) a rakoviny prsu (MDA-MB-231 a MCF-7). Výhodou je, že má menší cytotoxický účinek na normální buňky. Při použití narciklasinu v koncentraci 1 μM došlo k výrazným morfologickým změnám, které odpovídaly buněčné smrti. Během 24 hodin došlo ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, uvolnění cytochromu C do cytoplazmy a aktivaci kaspas. [32]

Narciklasin vykazuje silné cytotoxické účinky u buněčné linii HL-60 a HSC-2 (spinocelulární karcinom). Apoptóza buněk byla potvrzena morfologickými změnami jako je kondenzace chromatinu, fragmenty DNA, smrštěním buněk a aktivací kaspasy 3. Cytotoxická aktivita narciklasinu byla výraznější než při použití cisplatiny. [32]

Pankratistatin má také cytotoxické účinky. Je schopen u leukemických buněk indukovat apoptózu, která byla vyvolána aktivitou kaspasy 3, tvorbou reaktivních forem kyslíku a ztrátou potenciálu mitochondriální membrány. V buněčných liniích kožního karcinomu a lidského teratokarcinomu NT2 indukoval pankratistatin apoptózu bez negativních účinků na normální lidské fibroblasty. [32]

Hippeastrin inhibuje růst nádorových buněk lidského jaterního karcinomu HepG2 a leukemických buněk MOLT-4. [6] Bylo zjištěno, že hippeastrin vykazoval podobnou inhibiční aktivitu vůči topoizomerase I jako kamptotecin. Kamptotecin byl předlohou dvou protinádorových látek, které mají stejný mechanismus účinku a sice inhibici topoizomerasy I, jejíž exprese je zvýšená u nádorových buněk. Hippeastrin by mohl být vhodný kandidát na protirakovinné léčivo. Alkaloid má silné antiproliferativní účinky i u buněk kolorektálního karcinomu HT-29. [46]

3.2.3. Antimikrobiální aktivita – aktivita proti virům, bakteriím a kvasinkám

Lykorin vykazuje střední až silnou antivirovou aktivitu u viru *Herpes simplex 1*, HIV-1, koronaviru, polioviru, viru západonilské horečky, viru dengue, viru žluté zimnice, enteroviru, viru chřipky, viru hepatitidy C a viru Zika. Účinek vykazoval při velmi nízkých koncentracích, většinou při 1 μM koncentraci. Antivirový účinek lykorinu je dán zásahem do syntézy proteinů. Zásadní pro antivirovou aktivitu lykorinu jsou volné hydroxylové skupiny na C-1 a C-2, benzodioxolové uskupení, bazický dusík a dvojná vazba mezi uhlíky C-3 a C-4. Strukturální změny vedou ke ztrátě antivirové aktivity, např. rozrušením benzodioxolového

uskupení se ztrácí aktivita proti viru dengue a viru hepatitidy C. [42, 47] Antivirový účinek lykorinu byl sledován u poliovirů a coxsackie virů a zjistilo se, že jeho účinek je závislý na dávce. Při koncentraci 2,5, 10 a 25 μg/ml inhiboval růst viru v kultivačním médiu i ve Vero buňkách. Koncentrace 2,5 μg/ml se ukázala jako minimální pro jeho antivirovou aktivitu. Při koncentraci nad 20 μg/ml působil lykorin toxicky pro hostitelské buňky. [47] Lykorin vykazoval i aktivitu proti kvasinkám. Inhiboval kvasinky *Candida albicans*. Za jeho antifungální aktivitu jsou pravděpodobně zodpovědné hydroxylové skupiny na C-1 a C-2, protože karanin, který se liší ve své struktuře jen absencí hydroxylové skupiny na C-2, působil proti kvasinkám výrazně méně. [48]

Amarbellisin je dalším zástupcem alkaloidů lykorinového typu. Vykazuje aktivitu proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli* a kvasinkovým patogenům *Candida albicans*, jak ukázaly výsledky antibakteriálního a antifungálního screeningu. [32]

Ungeremin vykazuje antibakteriální vlastnosti. Kromě účinku na lidské topoizomerasy byl alkaloid testován na aktivitu proti bakteriálním topoizomerasam. Byly využity topoizomerasy z bakterie *Escherichia coli.* Bylo zjištěno, že ungeremin silně inhibuje topoizomerasu IV z bakterie *E. coli* s hodnotou IC_{50} 7,3 μM. Alkaloid vykazoval inhibici i u topoizomerasy I z bakterie *E. coli*, a to s hodnotou IC_{50} 15,0 μM. Dále se ukázalo, že ungeremin může zvyšovat štěpení DNA zprostředkované tímto enzymem až 250krát, to by znamenalo nové cílení v antimikrobiální chemoterapii. [49]

Haemanthamin a jeho polosyntetické deriváty vykazují *in vitro* antivirovou aktivitu proti viru chřipky A N5H1 [32]. Alkaloid vykazuje i antiretrovirové účinky [47].

Pretazettin silně inhibuje enzym reverzní transkriptasu v různých onkogenních virech, a to pomocí přímé vazby na enzym. Pretazettin zřejmě inhibuje syntézu proteinu během replikace viru, aniž by ovlivnil syntézu buněčné RNA a DNA. Alkaloid jeví aktivitu proti některým flavivirům, např. viru dengue nebo viru žluté zimnice. Vykazuje aktivitu i vůči viru *Herpes simplex*. [32]

Narciklasin má aktivitu proti některým bakteriím a virům. Alkaloid působí proti *Corynebacterium fascicans* a RNA virům jako jsou flaviviry a bunyaviry. Konkrétně vykazoval aktivitu u viru horečky Zika, viru dengue, viru žluté zimnice. Je účinný i proti *Cryptococcus neoformans.* [32, 47] Antifungální aktivitu vykázal alkaloid i proti *Candida albicans* [6].

Silnou aktivitu proti RNA virům vykazuje **pankratistatin**. Je účinný proti flavivirům a bunyavirům. Konkrétně vykázal aktivitu proti viru horečky Zika, viru žluté zimnice, viru dengue. [32, 47]

Při testování na antimikrobiální aktivitu se alkaloidy **amarbellisin**, **pankracin**, **vitatin** a **11-hydroxyvitatin** jevili účinně proti bakterii *Staphylococcus aureus*. Proti *Escherichia coli* působil amarbellisin a vitatin. U pankracinu se ukázala aktivita proti *Pseudomonas aeruginosa*. Všechny tyto testované alkaloidy se vyznačovali aktivitou proti kvasinkám *Candida albicans*. [48]

Hippeastrin vykazuje antivirovou aktivitu vůči viru *Herpes simplex*. Alkaloid je účinný i proti *Candida albicans*. [6]

3.2.4. Antiparazitická aktivita

Lykorin *in vitro* vykazuje významnou antimalarickou aktivitu proti kmenům *Plasmodium falciparum*, které jsou citlivé i rezistentní na chlorochin [32]. Pro antiplasmodiální aktivitu je nutná dvojná vazba mezi uhlíky C-3 a C-4. Volné hydroxylové skupiny na C-1 a C-2 pro tuto aktivitu nejsou nezbytné [42]. Lykorin je účinný i proti parazitovi *Trichomonas vaginalis*. Snižuje životaschopnost trofozoitů o 40 % při použití koncentrace 250 µg/ml. Bylo zjištěno, že u některých acylových analogů lykorinu aktivita proti *T. vaginalis* vzrostla v porovnání s lykorinem. [50]

Haemanthamin *in vitro* vykazuje aktivitu proti kmenu *Plasmodium falciparum*, který je citlivý na chlorochin s hodnotou IC_{50} 1,3 µM. Jeho antiplasmodiální aktivitu lze připisovat terciárnímu dusíku bez methylu a dále methylendioxybenzenové části molekuly. [32] Byla popsána aktivita proti dalším prvokovým parazitům – *Entamoeba hystolytica*, *Leishmania donovani, Trypanosoma brucei rhodesense* a *Trypanosoma cruzi*. Nejúčinnější byl haemanthamin proti *T. brucei rhodesiense* s hodnotou IC_{50} 0,49 µg/ml. [50]

Antiparazitickou aktivitu vykazuje *in vitro* také **haemanthidin**. Působí cidně proti kmenům *Plasmodium falciparum*, které jsou citlivé na chlorochin s hodnotou IC_{50} 1,2 µM. Dále je účinný proti *Trypanosoma brucei rhodesiense* a o něco méně účinný proti *T. cruzi*. [32, 50]

Pankratistatin má účinek proti parazitům, které způsobují infekce u lidí. Účinkuje proti mikrosporidiím. [32]

3.2.5. Protizánětlivá aktivita

Protizánětlivá aktivita nebyla tou hlavní aktivitou, která se u AmA sledovala, ale u některých alkaloidů byla odhalena a testována.

Protizánětlivě působí **norbelladin** tím, že inhibuje aktivitu jaderného faktoru-kappa B (NF-kappa B) a expresi cyklooxygenasy (COX) v relativně nízkých koncentracích. [42]

Jako první byla protizánětlivá aktivita **narciklasinu** zachycena na modelu artritidy u potkanů. Ukázalo se, že narciklasin snižuje otok nohou a snižuje produkci tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF-α) v myších makrofázích. Účinek alkaloidu vychází z inhibice syntézy proteinů. Později byl ve 2 myších modelech detekován protizánětlivý účinek narciklasinu. Bylo zabráněno prozánětlivé aktivaci leukocytů a endoteliálních buněk. Prokázala se silná inhibice transkripce genu závislého na NF-kappa B. [51]

Alkaloidy izolované z *Crinum bulbispermum* a *C. moorei* byly testovány na protizánětlivou aktivitu pomocí inhibice COX-1 a COX-2. Výsledkem inhibice měla být nižší tvorba prostaglandinů. Byla naměřena nízká inhibiční aktivita vůči COX-1 a COX-2 ve srovnání s indometacinem. [52]

Lykorin může blokovat produkci některých prozánětlivých molekul, např. oxidu dusného nebo prostaglandinu E2 [42]. V Rusku byl lykorin používán jako expektorans k léčbě chronických a akutních zánětů plic a k léčbě bronchiálních nemocí [32].

Haemanthidin působí protizánětlivě. U myší je jeho analgetická aktivita vyšší než u kyseliny acetylsalicylové nebo indometacinu. [32]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Příprava alkaloidních extraktů

4.1.1. Chemikálie

- Ethanol 95% (EtOH) (Penta a.s., Praha)
- Kyselina chlorovodíková 2% (HCl) (Penta a.s., Praha)
- Diethylether č. (Et_2O) (Penta a.s., Praha)
- Chloroform p.a. ($CHCl_3$) (Penta a.s., Praha)
- Uhličitan sodný 10% roztok (w/w) (Na_2CO_3) (Lachema)
- Síran sodný bezvodý č. (Na_2SO_4) (Penta a.s., Praha)
- Jodid draselný č. (KI) (Lach-Ner, Neratovice)
- Chlorid rtuťnatý p.a. ($HgCl_2$) (Penta a.s., Praha)
- Destilovaná voda (H_2O)

4.1.2. Činidla

- Mayerovo činidlo – roztok byl připraven rozpuštěním 5 g jodidu draselného ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g chloridu rtuťnatého (ve formě prášku). Nejprve vzniká sraženina jodidu rtuťnatého, která je po chvíli míchání rozpuštěna na komplexní tetrajodortuťnatan draselný. Objem činidla byl doplněn vodou do 100 ml. Výsledný roztok je čirý, nažloutlé, nanejvýš světle žluté barvy. Roztok se uchovává v chladničce při 4 °C, je stálý několik měsíců.

4.1.3. Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Heidolph – Hei-VAP Advatage G1
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10 P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890 A s hmotnostním detektorem 5975 C inert MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

4.1.4. Databáze použité k vyhodnocování výsledků

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

4.1.5. Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly použity cibule rodu *Narcissus*. Cibule byly zakoupeny od firmy Lukon Glads se sídlem v Lysé nad Labem. Po zakoupení byla provedena botanická identifikace prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Následně byly cibule zmraženy.

4.1.6. Příprava alkaloidního extraktu

Pro přípravu alkaloidních extraktů byly použity cibule různých kultivarů narcisů. Celkem bylo zpracováno 7 kultivarů. Cibule byly uchovávány v mrazáku a před zpracováním byly ponechány při laboratorní teplotě. Následně byly zváženy a dále zpracovány.

Jako první byl připraven ethanolický extrakt. Cibule byly pokrájeny a s dostatečným množstvím ethanolu rozmixovány tyčovým mixérem pro snadnější uvolnění obsahových látek. Ke směsi cibulí bylo přidáno 500 ml ethanolu a vše bylo vařeno na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 30 min. Směs cibulí a ethanolu byla následně filtrována přes vlizelín a cibule byly opětovně vařeny v ethanolu. Celkem se cibule vařily 3x. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce při 40 °C a 90 otáčkách/minutu. Takto bylo připraveno 7 sumárních ethanolických extraktů.

Následovalo čištění extraktů pomocí liquid-liquid extrakce. Ethanolický extrakt byl rozpuštěn v dostatečném množství (300 ml) 2% kyseliny chlorovodíkové. Byla použita ultrazvuková lázeň pro snazší rozpuštění extraktu. Extrakt byl přefiltrován do dělící nálevky přes vlizenlín, na kterém se zachytil škrob a další nerozpuštěné látky. Vytřepávání bylo provedeno třikrát, vždy s 200 ml diethyletheru. Z alkaloidů přítomných v ethanolickém extraktu po rozpuštění v HCl vznikla ve vodě rozpustná sůl, která je součástí vodné vrstvy. Organická vrstva tvořená etherem a dalšími balastními látkami, které do ní přešly, byla odpuštěna do organického odpadu. Vodná vrstva byla převrstvena 100 ml chloroformu a zalkalizována 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 10. Alkaloidy v zásaditém prostředí přejdou opět na volné báze a přecházejí do chloroformu. Další vytřepávání bylo provedeno s 200 ml chloroformu a to třikrát. Vodná vrstva byla podrobena testu s Mayerovým činidlem. Pro tento test bylo potřeba vodný roztok okyselit 2% HCl na hodnotu pH 3. Pokud by se po přidání Mayerova činidla objevil zákal, znamenalo by to přítomnost alkaloidů a bylo by třeba pokračovat s vytřepáváním. Zákal nevznikl, a proto byly spojené chloroformové vrstvy zbaveny zbytkové vody pomocí bezvodého síranu sodného, který byl následně odfiltrován přes filtrační papír. Dalším krokem bylo odpaření chloroformu na vakuové odparce při 40 °C

a 80 otáčkách/minutu a dosušení v exikátoru. Výsledné alkaloidní extrakty byly řádně uzavřeny proti vlhkosti a skladovány v lednici při 4 °C.

Během přípravy byly jednotlivé extrakty váženy a jejich výtěžky jsou zobrazeny v následující tabulce.

Tabulka 1 Výtěžky extraktů

Kultivar	Číslo vzorku	Hmotnost cibulí (g)	Ethanolický extrakt (g)	Alkaloidní extrakt (mg)
***Narcissus* cv. Arkle**	AL-719	309,7	24,7	599,8
***Narcissus* cv. Blazing Starlet**	AL-721	280,5	26,6	416,0
***Narcissus* cv. Dr. Alex Fleming**	AL-724	347,7	19,0	465,1
***Narcissus* cv. Heamor**	AL-727	187,3	12,9	436,3
***Narcissus* cv. Isha**	AL-730	283,9	26,9	255,7
***Narcissus* cv. Lorikeet**	AL-733	271,1	19,6	355,6
***Narcissus* cv. Woodland Star**	AL-744	229,7	11,9	197,2

4.2. Identifikace alkaloidů

K zjištění obsahu alkaloidů v jednotlivých extraktech byla využita GC-MS analýza. Pro měření bylo potřeba navážit cca 0,3 mg z každého extraktu a přidat 0,5 ml methanolu. K měření byl využit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C inert MSD, který pracuje s ionizačním potenciálem 70 eV. K separaci byla využita kolona HP-5MS s rozměry 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm a teplotní program 100-180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180-300 °C (5 °C/min), 300 °C (5 min). Jako nosný plyn bylo použito helium s rychlostí průtoku 0,8 ml/min. Nástřik vzorku (1 µl methanolického roztoku o koncentraci 1 mg/ml) byl proveden za teploty 180 °C při splitu 1:10. Měření hodnot probíhalo v rozsahu 40-600 m/z.

Samotná identifikace alkaloidů probíhala porovnáním získaných spekter z GC-MS analýzy se spektry, která jsou dostupná v komerční knihovně NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a se spektry látek získaných na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky.

4.3. Screening biologické aktivity

4.3.1. Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid (ATChI) (Sigma Aldrich, Praha)
- Butyrylthiocholin jodid (BuTChI) (Sigma Aldrich, Praha)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, Německo)
- 5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (DTNB) (Sigma Aldrich, Praha)
- Fosfátový pufr 100 mM
- Galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- Eserin (Sigma Aldrich, Praha)
- Huperzin A 95% (TAZHONGHUI-Tai´an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.3.2. Činidla

- Roztok 5mM DTNB – roztok byl připraven přímým rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100mM fosfátovém pufru pH 7,4, aby vznikl 5mM roztok slabě nažloutlé barvy.
- Roztok 10mM ATChI – roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý.
- Roztok 10 mM BuTChI – roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý.

4.3.3. Pufry

- 100 mM fosfátový pufr o pH 7,4 – byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200mM roztokem NaH_2PO_4 (1 litr roztoku obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B je 200mM roztokem Na_2HPO_4 (1 litr roztoku obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4).

4.3.4. Rekombinantní enzymy

Enzymy jsou připravovány rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové. Používá se médium obsahující enzymy, které se v čas potřeby naředí 100mM fosfátovým pufrem o pH 7,4 tak aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08-0,15 a pro BuChE 0,18-0,20. Médium je rozpipetováno dle potřeby

(dle vypočítaného množství potřebného pro následné ředění k měření) do Eppendorfek, zamraženo a uchováváno v mrazáku při teplotě -22 °C do doby použití.

4.3.5. Přístrojové vybavení a použité programy

- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Třepačka VWR standard analog shaker 1000 (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)
- Program GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, California, USA)

4.3.6. Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Pro stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterasam bylo naváženo 3-5 mg extraktů do Eppendorfek. Ke stanovení inhibiční aktivity byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Během měření je sledován nárůst absorbance za 1 min.

Pro stanovení aktivity enzymů bylo do 6 jamek mikrotitrační destičky napipetováno 8,3 µl média, 283 µl 5 mM DTNB a 8,3 µl DMSO. Vše bylo promícháno na třepačce po dobu jedné minuty a poté byla směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 min. Po inkubaci se přidalo 33,3 µl roztoku substrátu, a to buď 10mM ATChI nebo 10 mM BuTChI. Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 412 nm. Stanoví se rozdíl absorbance na začátku a na konci měření a stanoví se průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou podle vzorce:

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

$\% \, I$ – procento inhibice

$\Delta \, \mathrm{ABL}$ – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min

$\Delta \, \mathrm{ASA}$ – absorbance testovaného vzorku během 1 min

Ke stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů byl využit stejný způsob měření. Do mikrotitrační destičky byly napipetovány stejné objemy činidel, ale místo 8,3 µl DMSO byl pipetován roztok extraktu o příslušné koncentraci. Pro každou látku bylo použito 6 jamek (1 řada) a do poslední řady byl pipetován DMSO jako slepý vzorek. Nejdříve se provedlo screeningové měření, kdy se všechny látky měřily při koncentraci 50 µg/ml (in koncentrace).

U extraktů, které vykazovali při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 60 %, byla stanovena IC_{50}.

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla využita in koncentrační řada 500 – 50 – 5 – 0,5 – 0,05 µg/ml. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism. Získané hodnoty inhibiční aktivity IC_{50} pro jednotlivé extrakty byly porovnány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem, eserinem a Huperzinem A.

4.4. Izolace alkaloidů ze vzorku AL-730

4.4.1. Chemikálie

- Ethanol 95% (EtOH) (Penta a.s., Praha)
- Chloroform p.a. ($CHCl_3$) (Penta a.s., Praha)
- Toluen p.a. (To) (Penta a.s., Praha)
- Diethylamin p.a. (Et_2NH) (Penta a.s. Praha)
- Cyklohexan č. (CHX) (Penta a.s., Praha)
- Ethylacetát č. (EtAc) (Penta a.s., Praha)
- Bazický dusičnan bismutitý [$Bi(NO_3)_3$] (Penta a.s., Praha)
- Kyselina vinná p.a. ($C_4H_6O_6$) (Penta a.s., Praha)
- Jodid draselný č. (KI) (Lach-Ner, Neratovice)
- Destilovaná voda (H_2O)

4.4.2. Činidla

- Dragendorffovo činidlo – postup přípravy:
    - Roztok A – vznikne rozpuštěním 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
    - Roztok B – vznikne rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.
    - Zásobní roztok – vznikne smícháním roztoku A a roztoku B v objemovém poměru 1:1. Vzniklý roztok musí být uchováván v chladničce při 4 °C po dobu několika měsíců.
    - Detekční roztok – 5 ml zásobního roztoku se přidá k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Uchovává se v chladničce při 4 °C po dobu několika měsíců.

4.4.3. Přístrojové vybavení

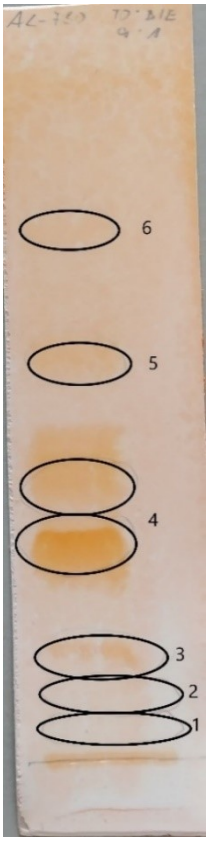
- Vakuová odparka Heidolph – Hei-VAP Advatage G1

4.4.4. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Extrakt AL-730 byl vybrán k izolaci alkaloidů pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie (TLC). Extrakt AL-730 byl zvolen, protože obsahuje v majoritním množství lykoramin, jak bylo zjištěno při GC-MS analýze. Lykoramin ve své struktuře obsahuje jednu volnou OH skupinu, takže by byl vhodný kandidát pro přípravu polosyntetických derivátů.

Nejdříve bylo potřeba orientačně zjistit, na kolik frakcí se extrakt AL-730 rozdělí. Malé množství vzorku bylo rozpuštěno ve směsi ethanolu a chloroformu v poměru 1:1. Roztok byl nanesen na komerční desku pomocí kapiláry alespoň 1 cm od okrajů. Deska se nechala zaschnout a nechala se vyvíjet v komoře nasycené mobilní fází. Komora se nechala sytit alespoň 30 min před vyvíjením. Jako mobilní fáze byla zvolena směs rozpouštědel toluenu a diethylaminu v poměru 9:1. Po vyjmutí desky z komory se nechala deska vysušit v digestoři.

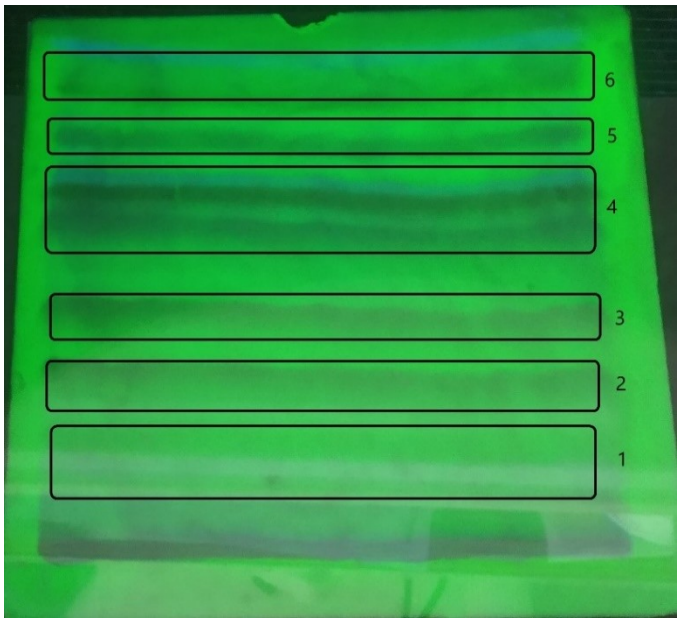
Dále byla provedena detekce pod UV světlem (254 nm). Alkaloidy zde zháší fluorescenci, takže jsou pozorovány jako tmavé skvrny. Pro další ověření byla deska postříkána Dragendorffovým detekčním činidlem. Dragendorffovo činidlo odhalilo alkaloidy jako oranžové skvrny (**Obr. 14**).



Obrázek 14 TLC vzorku AL-730 – soustava To:Et_2NH 9:1, detekce Dragendorffovým činidlem

Po detekci bylo rozhodnuto rozdělit vzorek AL-730 na 6 frakcí za využití preparativní TLC. Extrakt AL-730 byl rozpuštěn v dostatečném množství EtOH a $CHCl_3$ v poměru 1:1. Roztok byl nanesen na 8 litých desek se silikagelem pomocí pera ve vodorovné linii alespoň 1 cm od okrajů. Desky se nechaly vyvíjet v komorách nasycených směsí rozpouštědel toluenu a diethylaminu v poměru 9:1. Po vyjmutí desek z komor se nechaly vysušit v digestoři.

Pod UV lampou bylo detekováno několik zón a pomocí Dragendorffova činidla byla ověřena přítomnost alkaloidů, které se jeví jako oranžové skvrny. Jednotlivé zóny se stejným retenčním faktorem byly seškrábnuty a spojeny v kádinkách. Jednotlivé zóny jsou vidět na **Obr. 15**.



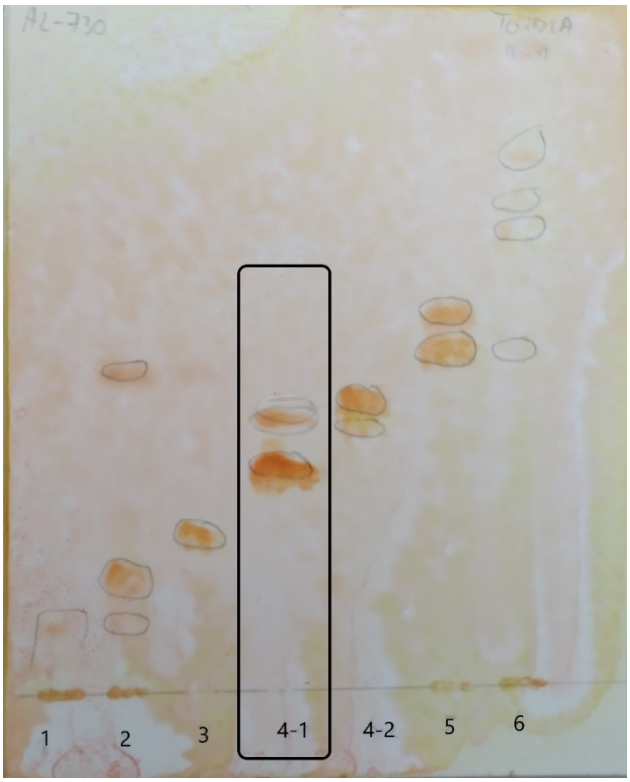
Obrázek 15 TLC vzorku AL-730 – soustava To: Et_2NH 9:1, detekce pod UV

Poté bylo potřeba oddělit silikagel od alkaloidů, a to pomocí eluce. Do elučního válce byla umístěna vata a na ní byla nasypána směs se silikagelem. Silikagel byl promýván směsí rozpouštědel EtOH a $CHCl_3$ v poměru 1:1. Vše bylo filtrováno pod tlakem pomocí vývěvy. Během eluce byla kapilárou nanesena část odkapávajícího eluátu na kousek TLC desky a byla zkoušena přítomnost alkaloidů pomocí Dragendorffova činidla. Ze získaného eluátu byla odpařena rozpouštědla na vakuové odparce při teplotě 40 °C. Takto bylo odděleno 6 frakcí, které byly označeny AL-730-1 až AL-730-6 (**Tab. 2**).

Tabulka 2 Hmotnosti frakcí vzorku AL-730

Název frakce	Hmotnost (mg)
AL-730-1	52,9
AL-730-2	16,7
AL-730-3	36,5
AL-730-4	140,4
AL-730-5	15,7
AL-730-6	17,6

Jednotlivé frakce vzorku AL-730 byly vyvíjeny na komerční desce ve směsi rozpouštědel toluenu a diethylaminu v poměru 9:1. Po detekci Dragendorffovým činidlem můžeme vidět zastoupení jednotlivých frakcí a jejich čistotu (**Obr. 16**).



Obrázek 16 TLC frakcí AL-730 – soustava To:Et_2NH 9:1, detekce Dragendorffovým činidlem

4.4.4.1. Zpracování frakce AL-730-4

Z **Obr. 14** a **Obr. 15** je patrné, že frakce 4 je složena z více látek a je potřeba najít lepší soustavu pro jejich oddělení. Frakce AL-730-4 byla rozpuštěna ve směsi EtOH a $CHCl_3$ v poměru 1:1 a byla nanesena na 5 komerčních desek o rozměru 20 x 10 cm. Desky byly dvakrát vyvíjeny ve směsi rozpouštědel cyklohexan, chloroform a diethylamin v poměru 45:45:10. Pod UV lampou byly detekovány a seškrábány 2 zóny, které byly označeny AL-730-4-1 a AL-730-4-2 (**Tab. 3**).

Tabulka 3 Hmotnosti podfrakcí AL-730-4

Název frakce	Hmotnost (mg)
AL-730-4-1	79,9
AL-730-4-2	27,8

4.4.4.2. Zpracování podfrakce AL-730-4-1

V dalším kroku izolace alkaloidů ze vzorku AL-730 bylo potřeba oddělit látky z podfrakce AL-730-4-1 (viz **Obr. 16**). Tato podfrakce byla rozpuštěna a nanesena na 5 komerčních desek se silikagelem o rozměru 20 x 10 cm. Desky byly vyvíjeny v komorách nasycených směsí rozpouštědel toluenu a diethylaminu v poměru 9:1. Po detekci pod UV lampou byly seškrábány 2 zóny, které dostaly označení AL-730-4-1-1 a AL-730-4-1-2 (**Tab. 4**).

Tabulka 4 Hmotnosti podfrakcí AL-730-4-1

Název frakce	Hmotnost (mg)
AL-730-4-1-1	64,3
AL-730-4-1-2	6,9

Pro ověření čistoty podfrakcí AL-730-4-1-1 a AL-730-4-1-2 se provedlo ještě jedno vyvíjení na komerční desce v soustavě To:Et_2NH v poměru 9:1. Detekce byla provedena Dragendorffovým činidlem. Podfrakce AL-730-4-1-1 se jevila čistě, ale podfrakce AL-730-4-1-2 ne a vzhledem k malému množství nebyla dále zpracována.

Obrázek 17 TLC podfrakce AL-730-4-1 – soustava To:Et_2NH 9:1, detekce Dragendorffovým činidlem

4.4.5. Identifikace látek z extraktu AL-730

Identifikace látek ze sumárního extraktu AL-730 byla provedena pomocí GC-MS a NMR.

4.4.5.1. NMR analýza

Čisté izolované látky byly následně podrobeny NMR analýze pro potvrzení předpokládané struktury. NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Měření i následnou interpretaci provedl doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. za využití spektrometru VNMR S500, který pracuje při frekvenci 500 MHz pro ^{1}H jádra a při frekvenci 125 MHz pro ^{13}C jádra. Měření proběhlo při teplotě 25 °C v roztocích $CDCl_3$. K ozařování i detekci signálu byla použita sonda OneNMR, která je širokopásmovou dvoukanálovou gradientní sondou se schopností regulace teploty. Chemické posuny δ byly změřeny jako hodnoty pars per milion (ppm) a nepřímo vztaženy k TMS (tetramethylsilanu) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Pro $CDCl_3$ jsou hodnoty chemického posunu u atomů ^{1}H δ = 7,26 ppm, u atomů ^{13}C δ = 77,0 ppm. Data získaná měřením jsou uvedena v následujícím pořadí: chemický posun δ (ppm), integrovaná intenzita ^{1}H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, dd = dublet dubletu, ddd = dublet dubletu dubletu, td = triplet dubletu, m = multiplet, bs = široký singlet), integrační konstanta *J* (Hz).

4.4.5.2. Optická otáčivost

Optická otáčivost vzorků byla měřena v roztocích vzorků pomocí automatického polarimetru. Měření bylo provedeno v prostředí methanolu při teplotě 25 °C, při koncentraci měřeného vzorku 0,1 g/100 ml a s délkou kyvety 0,5 dm. Pro každý vzorek bylo provedeno celkem 5 měření a z jejich průměrné hodnoty byla následně vypočítána specifická otáčivost pomocí níže uvedeného vzorce:

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

α = naměřená optická otáčivost [°]

t = teplota měření [°C]

D = vlnová délka D-linie sodíkového světla nm (= 589,3 nm)

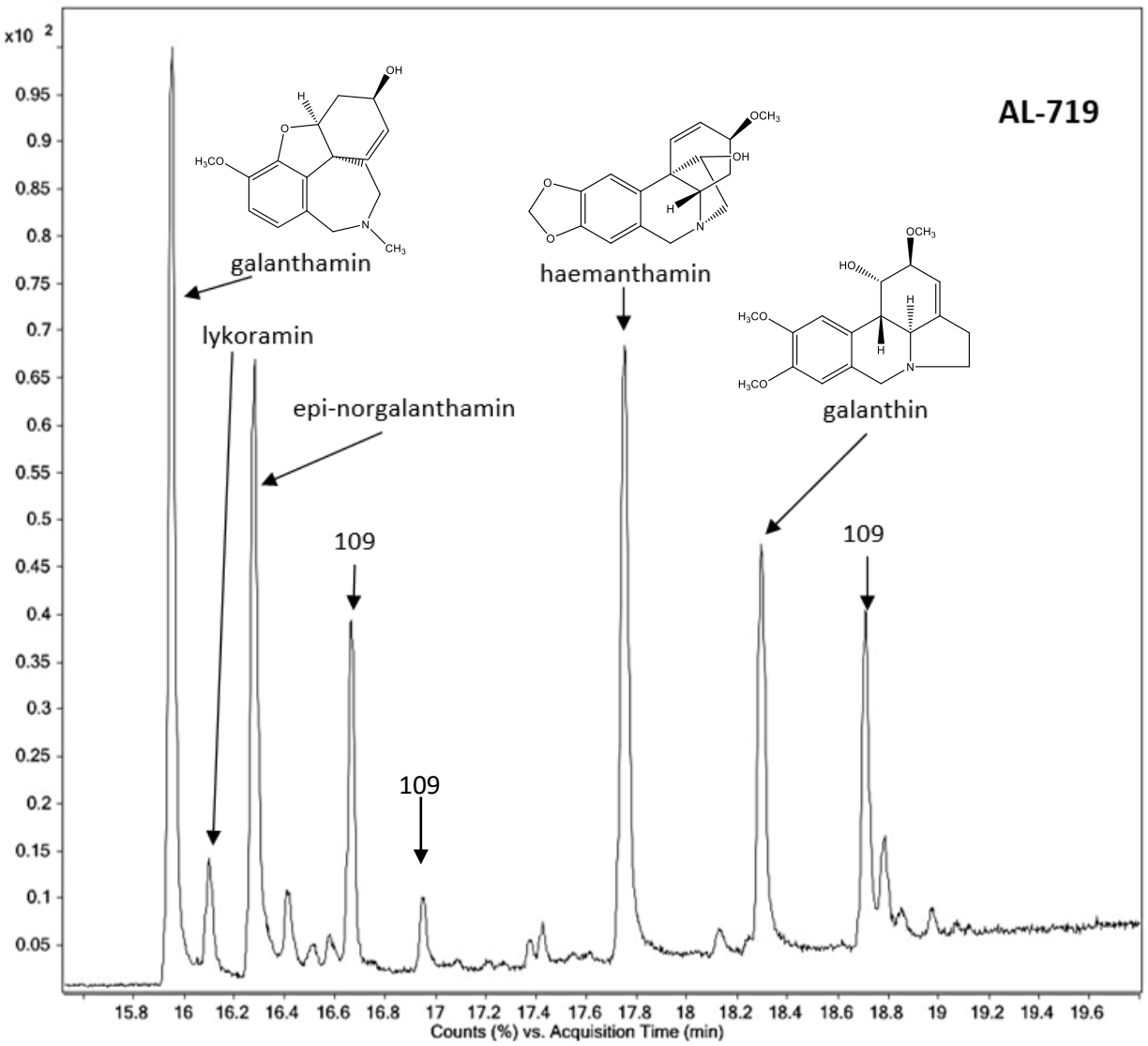
*c = k*oncentrace měřeného alkaloidu v roztoku [g/100 ml]

l = délka kyvety [dm]

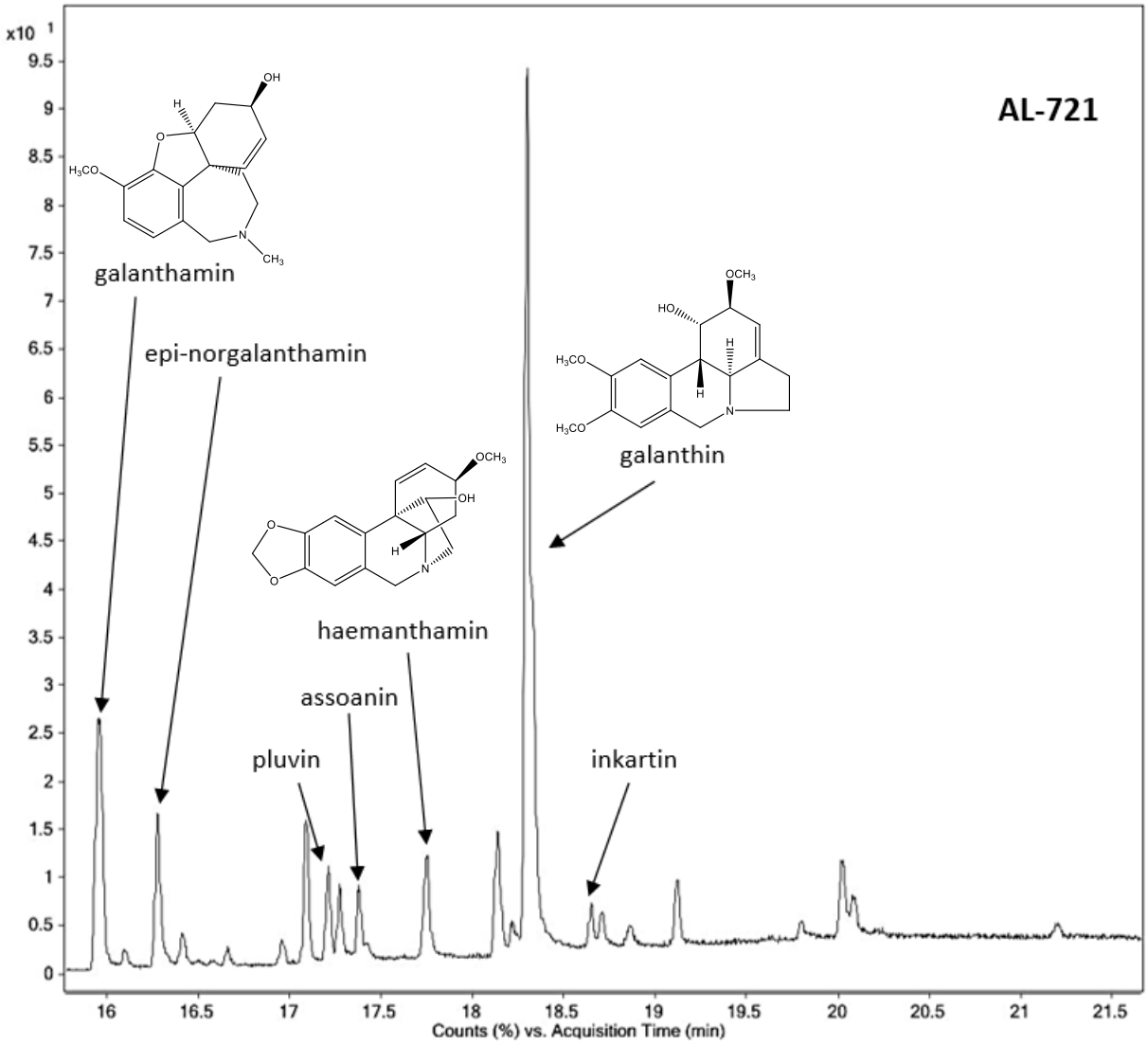
5. VÝSLEDKY

5.1. Chromatogramy jednotlivých alkaloidních extraktů

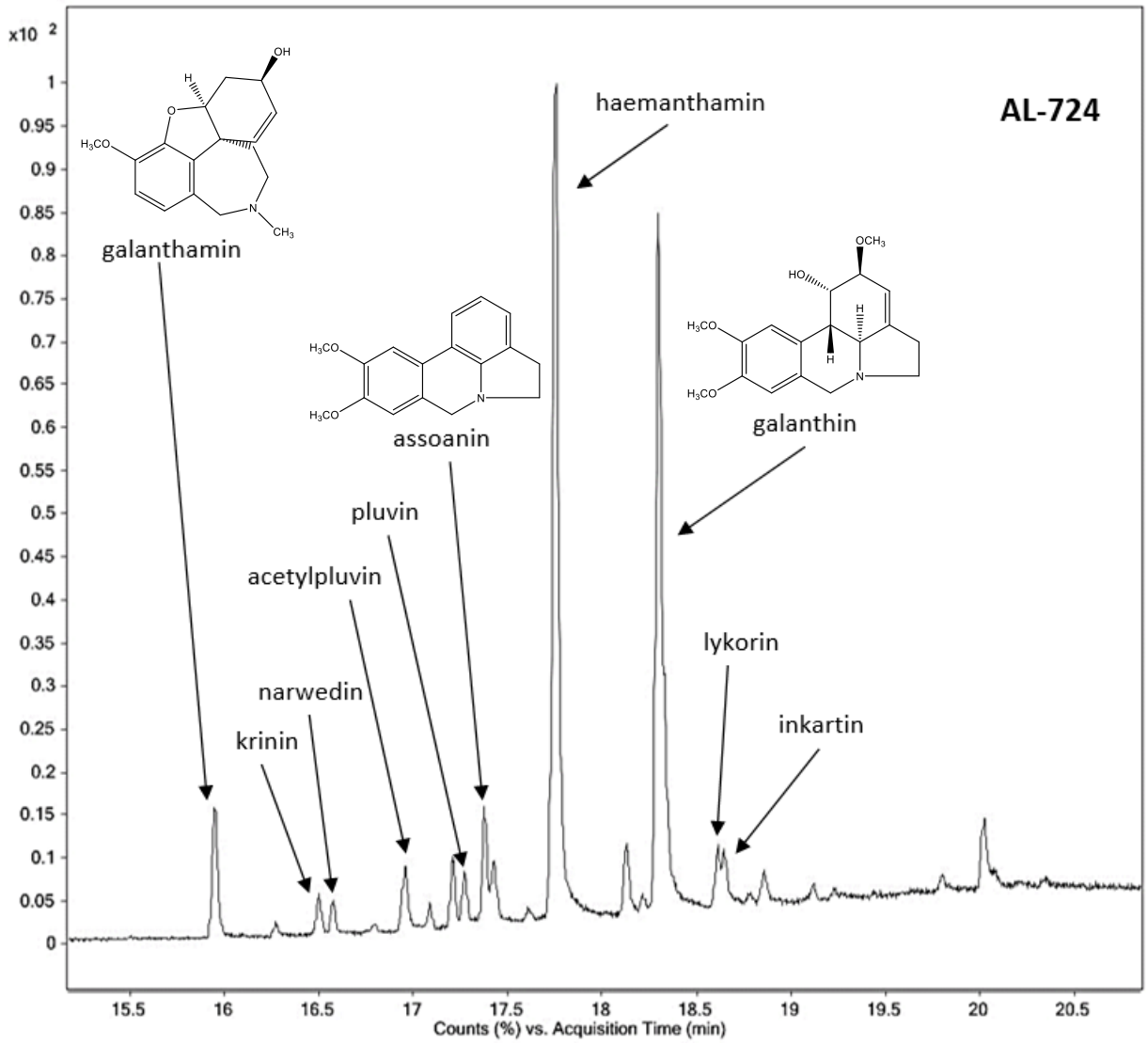
V následující kapitole jsou uvedeny jednotlivé chromatogramy alkaloidních extraktů získané z GC-MS.



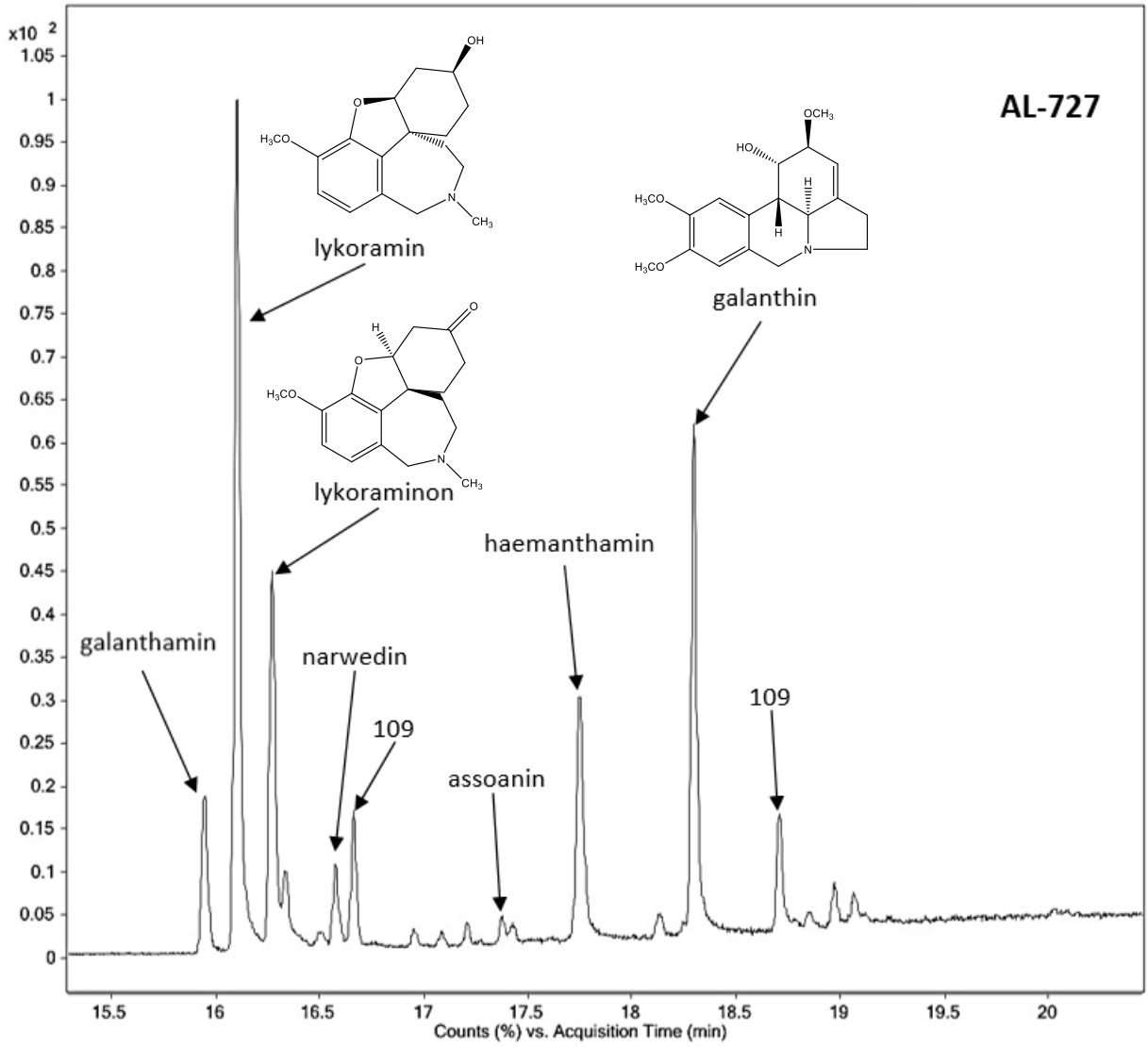
Obrázek 18 Chromatogram sumárního extraktu AL-719



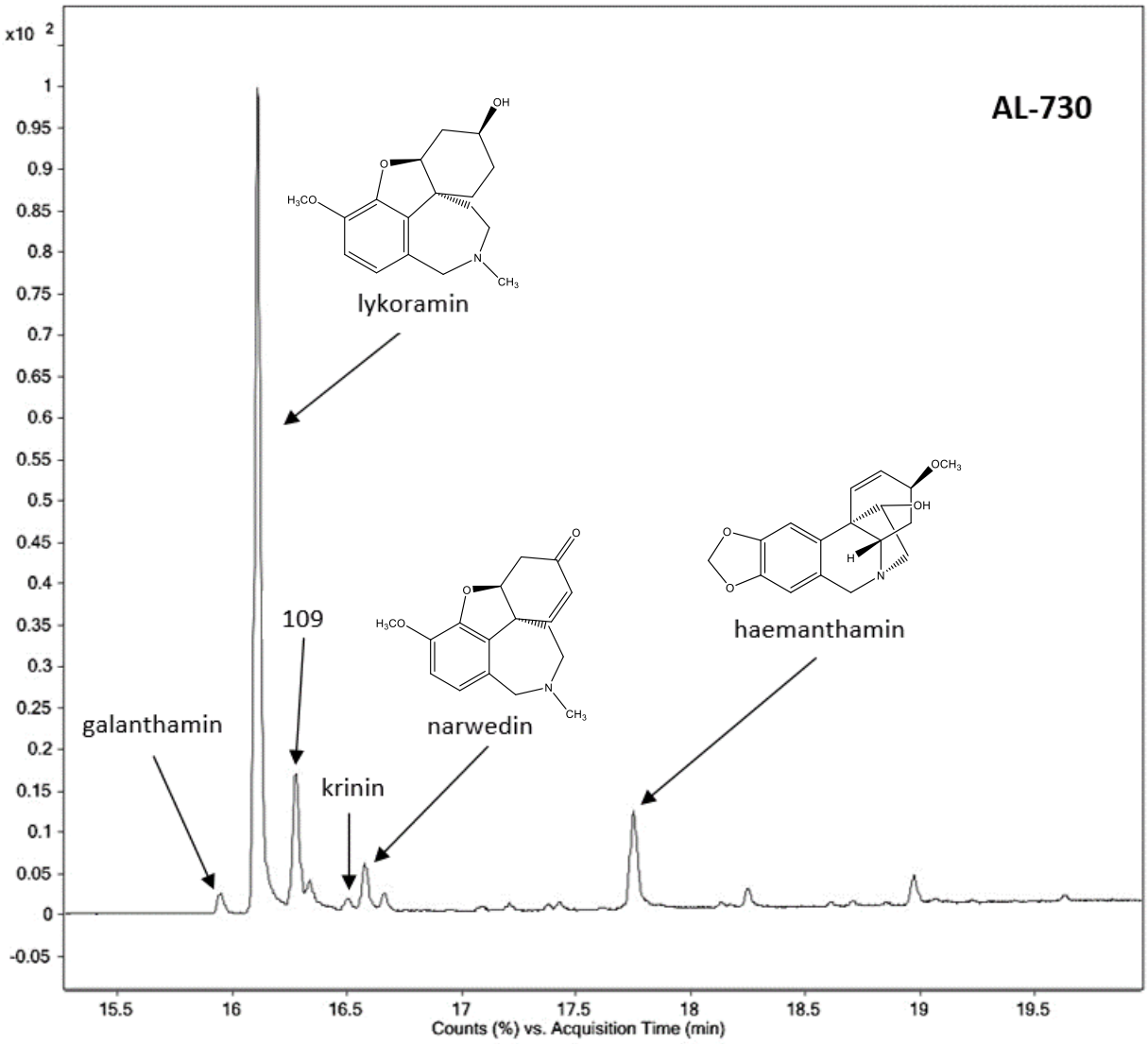
Obrázek 19 Chromatogram sumárního extraktu AL-721



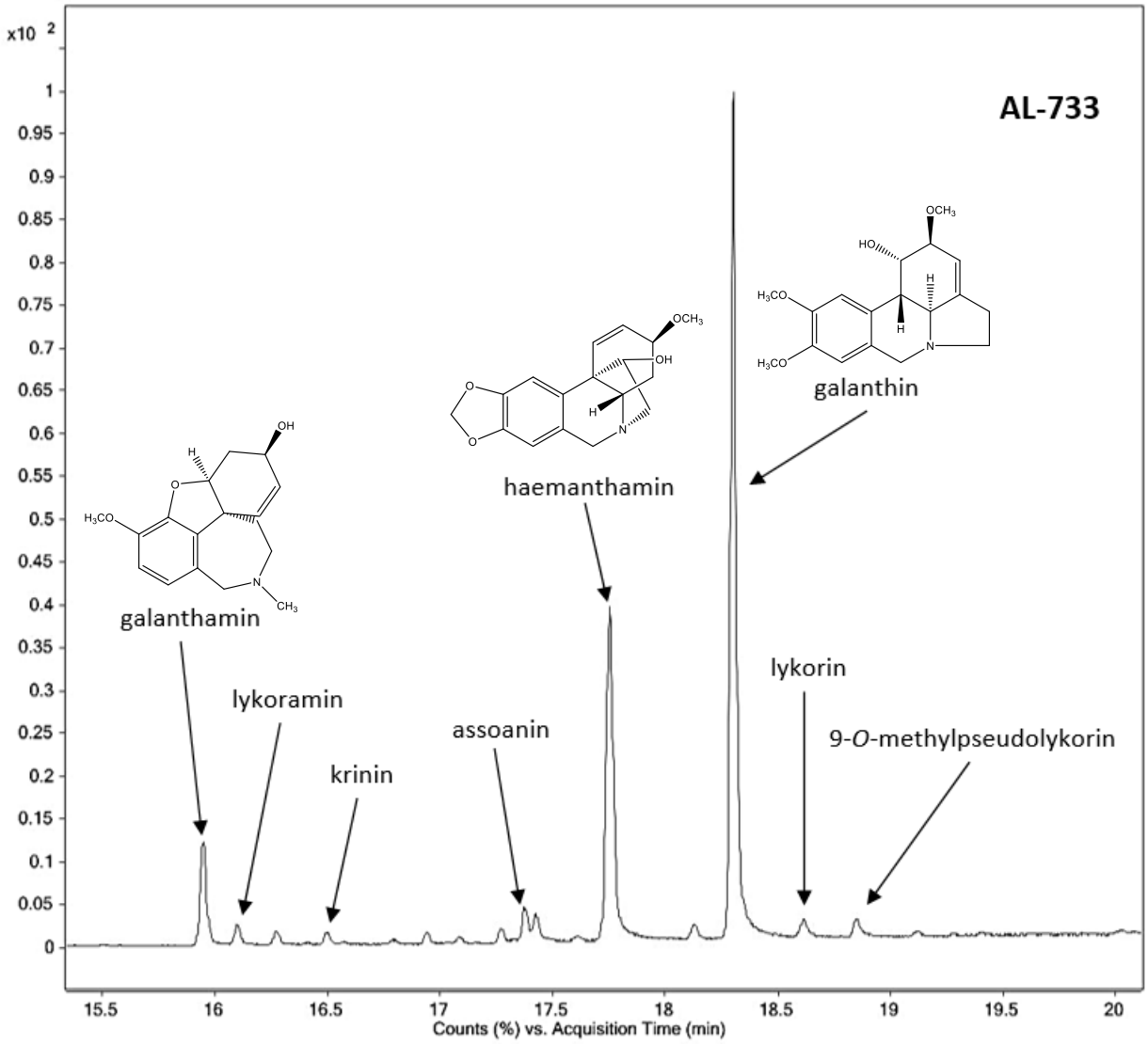
Obrázek 20 Chromatogram sumárního extraktu AL-724



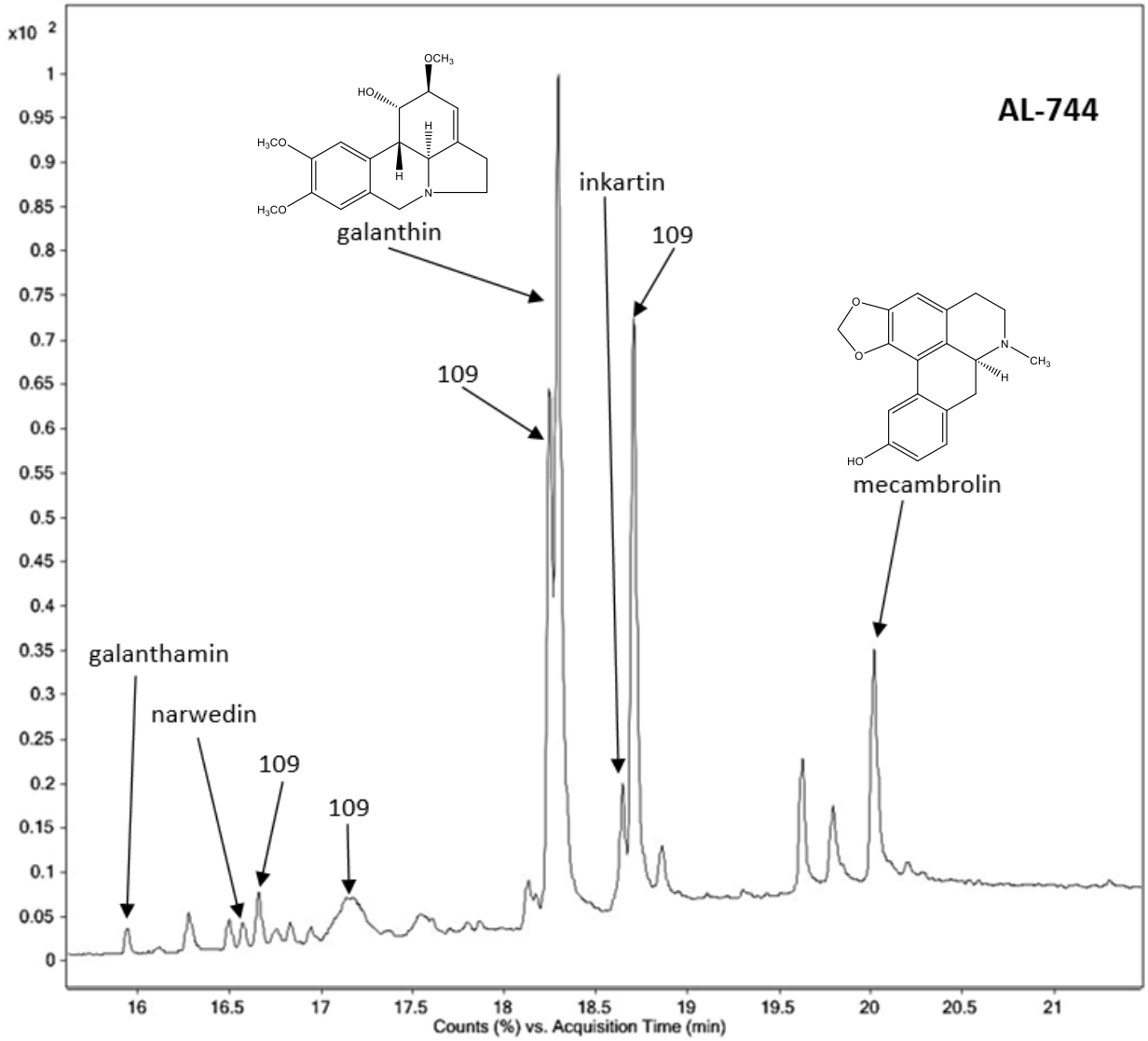
Obrázek 21 Chromatogram sumárního extraktu AL-727



Obrázek 22 Chromatogram sumárního extraktu AL-730



Obrázek 23 Chromatogram sumárního extraktu AL-733



Obrázek 24 Chromatogram sumárního extraktu AL-744

5.2. Přehled obsažených alkaloidů v extraktech

V této tabulce jsou uvedeny alkaloidy obsažené v jednotlivých extraktech na základě GC-MS analýzy.

Tabulka 5 Přehled alkaloidů v extraktech

Alkaloid	AL-719	AL-721	AL-724	AL-727	AL-730	AL-733	AL-744
acetylpluvin	-	-	+	-	-	-	-
assoanin	-	+	+	+	-	+	-
epi-norgalanthamin	+	+	-	-	-	-	-
galanthamin	+	+	+	+	+	+	+
galanthin	+	+	+	+	-	+	+
haemanthamin	+	+	+	+	+	+	-
inkartin	-	+	+	-	-	-	+
krinin	-	-	+	-	+	+	-
lykoramin	+	-	-	+	+	+	-
lykoraminon	-	-	-	+	-	-	-
lykorin	-	-	+	-	-	+	-
mecambrolin	-	-	-	-	-	-	+
narwedin	-	-	+	+	+	-	+
pluvin	-	+	+	-	-	-	-
109	+	-	-	+	+	-	+
9-*O*-methylpseudolykorin	-	-	-	-	-	+	-

5.3. Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky z měření inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterasam. U extraktů, které vykazovaly inhibiční aktivitu více než 60 %, byla stanovena hodnota IC_{50}.

Tabulka 6 Inhibiční aktivita extraktů a referenčních látek vůči AChE a BuChE

Číslo vzorku	AChE (% inhibice) při [50 µg/ml]	IC_{50} AChE µg/ml	BuChE (% inhibice) při [50 µg/ml]	IC_{50} BuChE µg/ml
AL-719	85,62 ± 2,17	2,09 ± 0,51	48,80 ± 1,70	>20
AL-721	80,51 ± 2,97	6,57 ± 0,18	59,99 ± 0,94	>20
AL-724	61,60 ± 2,37	18,66 ± 4,83	19,40 ± 0,56	>20
AL-727	74,66 ± 1,13	13,68 ± 1,03	30,21 ± 0,91	>20
AL-730	51,72 ± 1,76	>20	24,49 ± 0,65	>20
AL-733	80,04 ± 1,11	7,58 ± 0,54	27,44 ± 0,64	>20
AL-744	14,67 ± 1,10	>20	39,33 ± 1,38	>20
Referenční látka				
galanthamin HBr	100	0,74 ± 0,05	100	12,41 ± 0,98
eserin	100	0,06 ± 0,00	100	0,08 ± 0,03
Huperzin A	100	0,01 ± 0,00	-	-

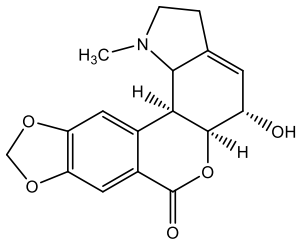
5.4. Izolované alkaloidy z extraktu AL-730

Z extraktu AL-730 se povedlo izolovat následující alkaloidy. Jejich identifikace byla provedena pomocí GC-MS, NMR a optické otáčivosti.

5.4.1. Frakce AL-730-2 – hippeastrin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{17}NO_5$

Molekulová hmotnost: 315,326



Obrázek 25 Struktura hippeastrinu

GC-MS analýza

MS (EI): *m/z* (%) = 297 (10), 279 (9), 190 (28), 126 (84), 125 (100), 124 (84), 96 (99).

MS (ESI): *m/z* (%) = 316 (M+1, 3), 298 (100), 287 (10), 280 (47), 262 (19), 239 (43), 191 (10).

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C):

7.48 (1H, s, H-11), 6.98 (1H, s, H-8), 6.08 (1H, s, OCH2O), 6.07 (2H, s, OCH2O), 5.70 (1H, s, H-4), 4.61 (1H, s, H-5a), 4.38 (1H, s, H-5), 3.25 (1H, m, H-2), 3.04 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-11b), 2.73 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-11c), 2.54 (2H, m, H-3), 2.31 (1H, dd, *J* = 17.2, 8.5 Hz, H-2), 2.10 (3H, s, NCH3).

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

165.0 (C-7), 151.9 (C-10), 148.0 (C-9), 142.4 (C-3a), 118.0 (C-7a), 138.8 (C-11a), 119.4 (C- 4), 109.8 (C-8), 108.5 (C-11), 102.1 (OCH2O), 82.2 (C-5a), 67.1 (C-11c), 66.2 (C-5), 55.9 (C- 2), 42.9 (NCH3), 38.4 (C-11b), 27.3 (C-3).

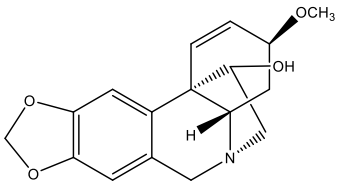
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$ = 142° (c = 0,105 mg/ml; $CHCl_3$)

5.4.2. Frakce AL-730-3 – haemanthamin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$

Molekulová hmotnost: 301,342



Obrázek 26 Struktura haemanthaminu

GC-MS analýza

MS (EI): *m/z* (%) = 301 (M+, 15), 272 (100), 240 (20), 257 (21), 211 (16), 181 (25).

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C):

6.74 (1H, s, H-10), 6.41 (1H, s, H-7), 6.36 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-1), 6.25 (1H, dd, *J* = 10.2, 4.7 Hz, H-2), 5.81 (1H, s, OCH2O), 5.76 (1H, s, OCH2O), 4.25 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H-6), 3.96 (1H, dd, *J* = 6.7, 3.3 Hz, H-11), 3.82 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H-6), 3.36 (3H, s, OCH3), 3.25 – 3.30 (2H, m, H-12, H-4a), 3.19 (1H, dd, *J* = 14.1, 3.3 Hz, H-12), 2.11 (1H, ddd, *J* = 13.8, 5.4, 1.8 Hz, H-4), 1.96 (1H, m, H-4).

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

146.5 (C-8), 147.0 (C-9), 135.0 (C-10a), 128.0 (C-1), 127.2 (C-2), 126.9 (C-6a), 106.9 (C-7), 103.3 (C-10), 101.0 (OCH2O), 80.0 (C-11), 73.0 (C-3), 63.3 (C-6), 62.7(C-4a), 61.5 (C-12), 56.0 (OCH3), 50.0 (C-10b), 29.5 (C-4).

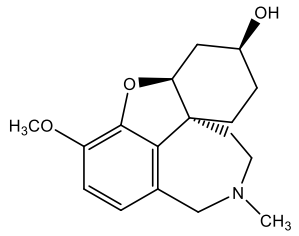
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$ = 37° (c = 0,29 mg/ml; $CHCl_3$)

5.4.3. Podfrakce AL-730-4-1-1 – lykoramin

Sumární vzorec: $C_{17}H_{23}NO_3$

Molekulová hmotnost: 289,37



Obrázek 27 Struktura lykoraminu

GC-MS analýza

MS (EI): *m/z* (%) = 289 (M+, 64), 288 (100), 274 (19), 232 (19), 202 (22), 115 (38).

NMR analýza

^{1}H NMR (500 MHz, δ, $CDCl_3$, 25 °C):

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

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

146.2 (C-9), 144.0 (C-10), 136.3 (C-10a), 129.1 (C-6a), 121.6 (C-7), 111.3 (C-8), 89.8 (C-1), 65.2 (C-3), 60.4 (C-6), 55.9 (OCH3), 54.1 (C-12), 46.7 (C-10b), 41.9 (NCH3), 31.7 (C-4a), 31.5 (C-2), 27.6 (C-4), 23.9 (C-11).

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25}$ = 67° (c = 0,269 mg/ml; $CHCl_3$)

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Alzheimerova choroba je nejčastějším typem demence. I když je nemoc intenzivně studována, její etiopatogeneze není plně objasněna. Na patologii AD se podílí několik faktorů, které vyúsťují v poškození neuronů. β-amyloidní plak vzniká vlivem patologického štěpení sekretasami a poškozuje neurony hlavně vně. Na intracelulárním poškození neuronů se podílí hyperfosforylovaný protein tau. Nedostatečná cholinergní transmise je výsledkem sníženého množství acetylcholinu, který je zapříčiněn degradujícími enzymy AChE a BuChE i nižším vznikem Ach. V terapii AD se používá omezené množství léčiv, která ale nejsou schopna nemoc vyléčit. Léčiva (inhibitory AChE a memantin) mohou zpomalit progresi nemoci a zlepšit kognitivní funkce pacientů, a tak zlepšit jejich kvalitu života. Galanthamin jako zástupce inhibitorů AChE a AmA se získává převážně z rostlinných zdrojů. Rod *Narcissus* je bohatým zdrojem galanthaminu i dalších amarylkovitých alkaloidů. Rozmanitost tohoto rodu dává příležitost k nalezení nových ekonomičtějších zdrojů léčivých látek. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae mají kromě inhibičních účinků na AChE a BuChE i další zajímavé účinky. Cytotoxické aktivitě AmA se v poslední době věnuje velká pozornost kvůli možnému využití při léčbě nádorových onemocnění. Protinádorové účinky vykazují především alkaloidy lykorinového typu. Další aktivity, které jsou předmětem výzkumu u AmA jsou antivirová, antibakteriální, antifungální, antiparazitická a protizánětlivá. [6, 35, 37]

V této diplomové práci bylo zpracováno 7 kultivarů rodu *Narcissus.* Jednalo se o *Narcissus* cv. Arkle (AL-719), *Narcissus* cv. Blazing Starlet (AL-721), *Narcissus* cv. Dr. Alex Fleming (AL-724), *Narcissus* cv. Heamor (AL-727), *Narcissus* cv. Isha (AL-730), *Narcissus* cv. Lorikeet (AL-733) a *Narcissus* cv. Woodland Star (AL-744). Z cibulí těchto kultivarů bylo připraveno 7 sumárních alkaloidních extraktů, které byly podrobeny GC-MS analýze. K identifikaci látek byly získané chromatogramy porovnány s knihovnou spekter NIST a se spektry látek získaných na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Celkem bylo identifikováno 16 alkaloidů a nejčastěji se v extraktech vyskytovaly galanthamin, galanthin a haemanthamin (**Tab. 5**).

Hlavním tématem práce byl screening biologické aktivity zmíněných kultivarů. Pro stanovení inhibiční aktivity extraktů při koncentraci 50 μg/ml vůči humánní AChE a BuChE byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Inhibiční aktivitu vyšší než 60 % vykazovalo 5 extraktů – AL-719, AL-721, AL-724, AL-727 a AL-733 (červené hodnoty

v **Tab. 6**). U těchto extraktů byla měřena i hodnota IC_{50}. Inhibiční aktivita extraktů byla porovnána s referenčními látkami – galanthaminem HBr, eserinem a Huperzinem A v μg/ml. Kultivar Arkle (AL-719) vykazoval nejslibnější inhibiční aktivitu vůči AChE a svou hodnotou IC_{50} = 2,09 ± 0,51 μg/ml se nejvíce blíží referenčnímu galanthaminu HBr. Aktivita kultivaru AL-719 může být dána vyšším zastoupením galanthaminu a epi-norgalanthaminu. U extraktů AL-730 a AL-744 byl galanthamin a jemu podobné látky zastoupeny významně méně, což může odrážet nižší inhibiční aktivitu vůči AChE. Žádný z testovaných kultivarů nevykazoval dostatečnou inhibiční aktivitu vůči BuChE.

Dalším cílem této diplomové práce byla izolace látek z extraktu AL-730 (*Narcissus* cv. Isha). Pomocí preparativní TLC byly získány 3 alkaloidy v čisté podobě. Z frakce AL-730-2 byl získán hippeastrin o hmotnosti 16,7 mg. Dalším alkaloidem získaným z frakce AL-730-3 byl haemanthamin s hmotností 36,5 mg. Frakce AL-730-4 byla rozdělena na 2 podfrakce a podfrakce AL-730-4-1 byla dále dělena. Třetí alkaloid byl získán z podfrakce AL-730-4-1-1 a byl identifikován jako lykoramin s hmotností 64,3 mg. Všechny tyto alkaloidy byly identifikovány pomocí GC-MS a NMR analýzy.

Hippeastrin by mohl být vhodný kandidát na protirakovinné léčivo. Jeho cytotoxický účinek souvisí s inhibicí topoizomerasy I, která je vysoce exprimována u nádorových buněk. [46]

Haemanthamin působí cytotoxicky na několika nádorových buněčných linií (MOLT-4, A549, HT-29, HeLa, MCF-7). Byly připraveny polosyntetické deriváty s cílem zvýšit cytotoxický účinek. Derivát 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthamin vykazoval výraznější antiproliferativní aktivitu vůči rakovinným buňkám než haemanthamin. [45] Polosyntetické deriváty haemanthaminu byly připraveny i pro měření inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE. Nejslibnější inhibice AChE byla pozorována u derivátů 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)-, 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)- a 11-*O*-(2-chlorbenzoyl)haemanthaminu. Poslední derivát vykazoval inhibiční aktivitu i vůči BuChE. Dalším derivátem, který prokázal inhibici BuChE byl 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)hemanthamin. [53]

Bylo zjištěno, že AmA jsou nejslibnějšími inhibitory humánní AChE. Analýza molekulárního dokování odhalila několik faktorů inhibičního působení vůči AChE. Jedná se o relativně silnou bazickou molekulu, strukturální flexibilitu nebo planární uspořádání pro lepší přístup k aktivnímu místu enzymu, přítomnost donorových a/nebo akceptorových substituentů vodíku (aminové skupiny, hydroxylové skupiny), struktura by měla být

hydrofobní s aromatickými kruhy. Ukázalo se, že lykoramin má nejvyšší inhibiční potenciál vůči AChE. [54] I když při screeningu aktivity extrakt AL-730, kde je lykoramin majoritně zastoupen, vykazoval inhibiční aktivitu vůči AChE jen 51,72 ± 1,76 %, mohl by lykoramin sloužit k přípravě polosyntetických derivátů, protože ve své struktuře obsahuje volnou hydroxylovou skupinu.

Závěrem lze konstatovat, že rod *Nasrcissus* je zajímavý zdroj alkaloidů. Jednotlivé kultivary by mohly být využity jako zdroj k izolaci látek. Alkaloidy samotné by mohly být testovány na další aktivity, které se u AmA objevují, být využity k přípravě polosyntetických derivátů nebo by se mohly stát předlohou nových léčiv, nejen na léčbu Alzheimerovy nemoci.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra Farmakognozie a farmaceutické botaniky

Řešitel: Zuzana Valešová

Školitel: PharmDr. Daniela Suchánková, Ph.D.

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

Klíčová slova: *Narcisus* sp., cibule, alkaloidní extrakty, GC/MS analýza, biologická aktivita, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa

Rostliny čeledi Amaryllidaceae mají dlouhou historii v používání jako tradiční léčiva. Rostliny této čeledi produkují strukturně unikátní isochinolinové sloučeniny, které dostali označení „Amarylkovité alkaloidy“. Bylo izolováno přes 600 amarylkovitých alkaloidů, které se vyznačují zajímavou biologickou aktivitou. Byla popsána aktivita cytotoxická, antimikrobiální, antiparazitická, protizánětlivá, ale nejznámější je inhibiční aktivita vůči enzymům acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase, která se v praxi využívá k terapii Alzheimerovy choroby. [8, 9] Rod *Narcissus* je znám především jako okrasná rostlina, která kvete časně na jaře. Narcisy se ale využívají i k izolaci galanthaminu, či jiných alkaloidů, které jsou zkoumány pro své účinky. [13]

Cílem této diplomové práce byl screening biologické aktivity u extraktů rodu *Narcissus*. Bylo připraveno 7 extraktů z cibulek 7 kultivarů rodu *Narcissus*. Cibule byly extrahovány ethanolem. Ethanolové extrakty byly přečištěny pomocí liquid-liquid extrakce etherem a chloroformem. Všechny extrakty byly analyzovány na GC-MS a na základě výsledků byly identifikovány tyto alkaloidy: galanthamin, haemanthamin, galanthin, lykoramin a v menším množství další alkaloidy. Extrakty byly dále testovány pro svou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody s využitím rekombinantních enzymů. Extrakty AL-719, AL-721, AL-724, AL-727, AL-733 vykazovaly inhibiční aktivitu vyšší než 60 %. Pro tyto extrakty byla stanovena hodnota IC_{50}. Z extraktu AL-730 se pomocí preparativní TLC povedlo izolovat alkaloidy hippeastrin, haemanthamin a lykoramin. Z výsledků vyplývá, že Amarylkovité alkaloidy mají velký potenciál nejen k léčbě Alzheimerovy choroby.

8. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical botany

Author: Zuzana Valešová

Supervisor: PharmDr. Daniela Suchánková, Ph.D.

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

Key words: *Narcisus* sp., bulbs, alkaloidal extracts, GC/MS analysis, biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

Plants of the family Amaryllidaceae have a long history of using as traditional remedies. Plants of this family produce structurally unique isoquinoline compounds, which have been called „Amaryllidaceae alkaloids". Over 600 Amaryllidaceae alkaloids have been isolated, which are characterized by interesting biological activity. Cytotoxic, antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory activity has been described, but the best known is the inhibitory activity against the enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, which is used in practice for therapy of Alzheimer´s disease. [8, 9] The genus *Narcissus* is primarily known as decorative plants that blooms in early spring. However, daffodils are also used to isolate galanthamine or other alkaloids that are being studied for their effect. [13]

The aim of this thesis was to screen the biological activity of extracts of the genus *Narcissus*. It was prepared 7 extracts from bulbs of 7 cultivars of the genus *Narcissus*. Bulbs were extracted by boiling in ethanol. Ethanolic extracts were purified by liquid-liquid extraction with ether and chloroform. All extracts were analyzed on GC-MS and on basis of results were identified these alkaloids: galanthamine, haemanthamine, galanthine, lycoramine and in smaller quantities some others. Extracts were further tested for their activity against AChE and BuChE using Ellman spectrophotometric method using recombinant enzymes. Five extracts (AL-719, AL-721, AL-724, AL-727, AL-733) showed inhibitory activity higher than 60 %. An IC_{50} value was determined for these extracts. The alkaloids hippeastrine, haemanthamine and lycoramine were isolated from the extract AL-730 using preparative TLC. The result show that Amaryllidaceae alkaloids have great potential not only for the treatment of Alzheimer´s disease.

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Dohnal F. *Studijní texty k dějinám farmacie*, 1. vyd.; Karolinum: Praha, 2014

2. Jahodář L. *Farmakobotanika – semenné rostliny*, 3. vyd.; Karolinum: Praha, 2011

3. Spilková J., Jan M., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M. *Farmakognozie*; Karolinum: Praha, 2016

4. Jahodář L. *Rostliny způsobující otravy*, 1. vyd.; Karolinum: Praha, 2018

5. Švihovec J., Bultas J., Anzenbacher P., Chládek J., Příborský J., Slíva J., Votava M. *Farmakologie*, 1. vyd.; Grada Publishing: Praha, 2018

6. Dalecká M., Havelek R., Královec K., et al. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. Chemické Listy, 2013, 107, 701–708

7. Štěpánková J., Chrtek J., Kaplan Z. *Květena České republiky 8*; Academia, Praha, 2010

8. Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J., et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum* X *Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer´s disease. South African journal of botany, 2021, 136, 137-146

9. Bastida J., Lavilla R., Viladomat F. Chemical and biological aspects of *Nasrcissus* alkaloids. The alkaloids: Chemistry and Biology, 2006, 63, 87-179

10. Nunez D. R., De Castro C. O., Ruiz S. R., et al. The origin of cultivation and wild ancestors of daffodils (*Narcissus* subgenus Ajax) (Amaryllidaceae) from an analysis of early illustrations. Scientia Horticulturae, 2003, 98, 307-330

11. https://botany.cz/foto/narcissus2.jpg (staženo 4.2.2023)

12. https://www.biolib.cz/IMG/GAL/BIG/115226.jpg (staženo 4.2.2023)

13. Hanks G. R. (ed.) *Narcissus and Daffodil: the genus Narcissus*, 1st ed.; CRC Press: London, 2002

14. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Arkle (staženo 4.2.2023)

15. http://www.lukon-glads.cz/uploads/product/detail/6777.jpg (staženo 1.2.2023)

16. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Blazing+Starlet (staženo 5.2.2023)

17. http://www.lukon-glads.cz/narcis-blazing-starlet-p-3661 (staženo 5.2.2023)

18. http://www.lukon-glads.cz/uploads/product/detail/5601.jpg (staženo 1.2.2023)

19. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Doctor+Alex+Fleming (staženo 5.2.2023)

20. http://www.lukon-glads.cz/velkokorunne-98 (staženo 5.2.2023)

21. http://www.lukon-glads.cz/uploads/product/detail/7688.jpg (staženo 1.2.2023)

22. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Heamoor (staženo 8.2.2023)

23. http://www.lukon-glads.cz/uploads/product/detail/7033.jpg (staženo 1.2.2023)

24. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Isha (staženo 8.2.2023)

25. http://www.lukon-glads.cz/narcis-isha-p-5465 (staženo 8.2.2023)

26. http://www.lukon-glads.cz/uploads/product/detail/7910.jpg (staženo 1.2.2023)

27. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Lorikeet (staženo 8.2.2023)

28. http://www.lukon-glads.cz/uploads/product/detail/7656.jpg (staženo 1.2.2023)

29. https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Woodland+Star (staženo 8.2.2023)

30. https://daffseek.org/wp-content/uploads/2020/03/IMG_2304-768x512.jpg (staženo 8.2.2023)

31. Li W., Qiao C., Pang J., et al. The versatile O-methyltransferase LrOMT catalyzes multiple O-methylation reactions in amaryllidaceae alkaloids biosynthesis. International journal of biological macromolecules, 2019, 141, 680-692

32. Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., et al. The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. Natural Product Communications, 2016, 11, 1587-1594

33. Jirák R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Praktické lékárenství, 2012, 8, 107-108

34. Torras-Claveria L., Berkov S., Codina C., et al. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. Industrial Crops and Products, 2013, 43, 237-244

35. Ferreira-Vieira T. H., Guimaraes I. M., Silva F. R., et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. Current Neuropharmacol, 2016, 14, 101-115

36. Franková V. Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. Psychiatrie pro praxi, 2015, 3, 79-82

37. Long J. M., Holtzman D. M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. Cell, 2019, 179, 312-339

38. Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. Dialogues in Clinical Neuroscience, 2013, 15, 445-454

39. Arbor S. C., LaFontaine M., Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets – protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. Yale Journal of Biology and Medicine, 2016, 89, 5-21

40. Silbernagl S., Lang F. *Atlas patofyziologie*, 2. české vyd.; Grada Publishing: Praha, 2012

41. Wegmann S., Biernat J., Mandelkow E. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. Current Opinion in Neurobiology, 2021, 69, 131-138

42. Roy M., Liang L., Xiao X., et al. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 107, 615-624

43. Liu J., Hu W. X., He L. F., et al. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. FEBS letters, 2004, 578, 245-250

44. Li L., Dai H. J., Ye M., et al. Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. Cancer Cell International, 2012, 12, 1-6

45. Uher M., Hroch M., Peřinová R., et al. Semisynthetic derivatives of haemanthamine and their *in vitro* antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15, 103746

46. Chen G. L., Tian Y. Q., Wu J. L., et al. Antiproliferative activities of Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* targeting DNA topoisomerase I. Scientific Reports, 2016, 6, 1-10

47. Nair J. J., van Staden J. Antiviral alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. Phytomedicine, 2023, 108, 154480

48. Ločárek M., Nováková J., Klouček P., et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. Natural product communications, 2015, 10, 1537-1540

49. Casu L., Cottiglia F., Leonti M., et al. Ungeremine effectively targets mammalian as well as bacterial type I and type II topoisomerases. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2011, 21, 7041-7044

50. Nair J. J., van Staden J. Antiprotozoal alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2019, 29, 126642

51. Fürst R. Narciclasine – an amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. Planta Medica, 2016, 82, 1389-1394

52. Elgorashi E. E., Zschocke S., van Staden J., et al. The anti-inflammatory and antibacterial activities of Amaryllidaceae alkaloids. South African Journal of Botany, 2003, 69, 448-449

53. Peřinová R., Maafi N., Korábečný J. et al. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease. Bioorganic Chemistry, 2020, 100, 103928-103937

54. López A. F. F., Martínez O. M. M., Hernández H. F. C. Evaluation of Amaryllidaceae alkaloids as inhibitors of human acetylcholinesterase by QSAR analysis and molecular docking. Journal of Molecular Structure, 2021, 1225, 129142