

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

SCREENING BIOLOGICKÉ AKTIVITY RŮZNÝCH DRUHŮ ROSTLIN Z ČELEDI

AMARYLLIDACEAE

Autor: Kateřina Němečková

Vedoucí práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové 2024

**CHARLES UNIVERSITY**

**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ**

**DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY**



## **DIPLOMA THESIS**

**SCREENING OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF VARIOUS SPECIES OF THE FAMILY**

**AMARYLLIDACEAE**

Author: Kateřina Němečková

Thesis supervisor: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové 2024

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové, 2024

.....

Kateřina Němečková

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost při vysvětlování laboratorních postupů, detailní popisování práce s přístroji a za přínosné připomínky při samotném sepisování diplomové práce. Moje poděkování patří i dalším pracovníkům katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky, kteří byli ochotní poskytnout radu či pomoc vždy, když bylo třeba. Závěrem děkuji své rodině a kamarádům za vytvoření příjemného prostředí pro psaní.

## Obsah

Seznam obrázků.....	8
Seznam tabulek .....	9
Seznam použitých zkratk .....	10
1 Úvod .....	11
2 Cíl práce.....	13
3 Teoretická část .....	14
3.1 Čeleď Amaryllidaceae .....	14
3.1.1 Taxonomická klasifikace Amaryllidaceae.....	14
3.1.2 Morfologie .....	14
3.1.3 Využití.....	15
3.1.4 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae .....	15
3.1.4.1 Historie .....	15
3.1.4.2 Účinky .....	15
3.1.4.3 Obecná charakteristika struktury.....	16
3.1.4.4 Základní biosyntéza .....	16
3.1.4.5 Typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae .....	17
3.2 Zkoumané druhy rostlin Amaryllidaceae .....	25
3.2.1 <i>Crinum erubescens</i> L.f. ....	25
3.2.2 <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Voss .....	26
3.2.3 <i>Hippeastrum striatum</i> (Lam.) H.E.Moore .....	27
3.2.4 <i>Hymenocallis occidentalis</i> (Leconte) Kunth .....	28
3.3 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae .....	29
3.3.1 Neurotransmise .....	29
3.3.2 Acetylcholin.....	29

3.3.3	Cholinesterasy.....	30
3.3.3.1	Acetylcholinesterasa .....	31
3.3.3.2	Butyrylcholinesterasa.....	31
3.3.4	Inhibitory acetylcholinesterasy.....	32
3.3.5	Alzheimerova choroba.....	32
4	Experimentální část.....	35
4.1	Potřeby.....	35
4.1.1	Rozpouštědla a chemikálie .....	35
4.1.2	Detekční činidla.....	35
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	35
4.1.4	Databáze použité k vyhodnocení výsledků.....	36
4.1.5	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii .....	36
4.1.6	Chromatografické adsorbenty .....	36
4.1.7	Rostlinný materiál .....	36
4.2	Všeobecné postupy.....	37
4.2.1	Příprava alkaloidních extraktů .....	37
4.2.2	Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	37
4.2.3	Detekce alkaloidů.....	38
4.2.4	GC-MS analýza alkaloidních extraktů .....	38
4.3	Screening inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE .....	40
4.3.1	Potřeby.....	40
4.3.1.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	40
4.3.1.2	Činidla.....	40
4.3.1.3	Tlumivé roztoky .....	40
4.3.1.4	Přístrojové vybavení.....	41

4.3.2	Rekombinantní enzymy .....	41
4.3.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE .....	41
4.3.3.1	Stanovení inhibiční aktivity enzymů.....	41
4.3.3.2	Stanovení inhibiční aktivity extraktů.....	42
4.3.3.3	Stanovení hodnoty IC <sub>50</sub> .....	42
5	Výsledky .....	43
5.1	Zpracování výsledků screeningu .....	43
5.1.1	AL-751 .....	44
5.1.2	AL-752 .....	48
5.1.3	AL-753 .....	52
5.1.4	AL-754 .....	54
5.2	Výsledky inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE .....	59
6	Diskuse a závěr .....	60
7	Seznam použité literatury .....	62
	Abstrakt .....	69
	Abstract .....	70

## Seznam obrázků

Obrázek 1 – L-fenylalanin .....	16
Obrázek 2 – L-tyrosin .....	16
Obrázek 3 – 4'-O-methylnorbelladin .....	17
Obrázek 4 – Lykorin .....	18
Obrázek 5 - Homolykorin .....	19
Obrázek 6 - Haemanthamin .....	19
Obrázek 7 - Haemathidin .....	19
Obrázek 8 – Krinin .....	20
Obrázek 9 – Tazettin .....	21
Obrázek 10 – Montanin .....	21
Obrázek 11 - Narciklasin .....	23
Obrázek 12 – Pankratistatin .....	23
Obrázek 13 – Galanthamin .....	24
Obrázek 14 – Belladin .....	24
Obrázek 15 – <i>Crinum erubescens</i> .....	26
Obrázek 16 – <i>Hippeastrum puniceum</i> .....	27
Obrázek 17 – <i>Hippeastrum striatum</i> .....	28
Obrázek 18 – <i>Hymenocallis occidentalis</i> .....	29
Obrázek 19 – Acetylcholin .....	30
Obrázek 20 – TLC po postřiku Dragendorffovým činidlem .....	38
Obrázek 21 – Chromatogram ethylacetátového extraktu .....	44
Obrázek 22 – Chromatogram ethylacetátového extraktu .....	48
Obrázek 23 – Chromatogram chloroformového extraktu .....	50
Obrázek 24 – Chromatogram chloroformového extraktu .....	52
Obrázek 25 – Chromatogram ethylacetátového extraktu .....	54
Obrázek 26 – Chromatogram chloroformového extraktu .....	56



## Seznam tabulek

Tabulka 1 – Přehled rozpouštědel a chemikálií.....	35
Tabulka 2 – První vyvíjecí soustava .....	36
Tabulka 3 – Druhá vyvíjecí soustava.....	36
Tabulka 4 – Přehled rozpouštědel a chemikálií.....	40
Tabulka 5 – Výsledné hmotnosti alkaloidních extraktů .....	43
Tabulka 6 – Predikce alkaloidů obsažené v ethylacetátovém extraktu .....	44
Tabulka 7 – Predikce alkaloidů obsažené v ethylacetátovém extraktu .....	48
Tabulka 8 – Predikce alkaloidů obsažené v chloroformovém extraktu .....	50
Tabulka 9 – Predikce alkaloidů obsažené v chloroformovém extraktu .....	52
Tabulka 10 – Predikce alkaloidů obsažené v ethylacetátovém extraktu .....	54
Tabulka 11 – Predikce alkaloidů obsažené v chloroformovém extraktu .....	56
Tabulka 12 – Porovnání jednotlivých alkaloidů obsažených v ethylacetátových a chloroformových extraktech .....	58
Tabulka 14 – Výsledky stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasam .....	59

## Seznam použitých zkratk

AA	alkaloidy čeledi Amaryllidaceae
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEi	inhibitor acetylcholinesterasy
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
ChE	cholinesterasa
NT	neurotransmitter
PSEN	presenilin
SM	sekundární metabolit
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

# 1 Úvod

Asi před 2,5 miliardami let se začala vyvíjet rostlinná fotosyntéza. Fotosyntéza způsobila zvýšení hladiny kyslíku v atmosféře, Země dosáhla vhodných podmínek pro obývání a rostliny se staly nezbytným aspektem pro život. Kromě produkce organické hmoty z anorganických látek, tedy pohlcování oxidu uhličitého a jeho přeměny na uhlík, se v průběhu fotosyntézy uvolňuje jako vedlejší produkt kyslík. Produkce kyslíku se tak stala největším přínosem rostlin, protože umožňuje organismům dýchat vzduch, něhož je kyslík hlavní součástí.

Rostlinná říše poskytuje i další ekosystémové služby, například čistí venkovní a vnitřní ovzduší. Prostřednictvím svých listů pohlcují rostliny plynné škodlivé látky (ozón, oxidy dusíku a oxidy síry), když přijímají oxid uhličitý pro fotosyntézu. Kromě plyných látek také zachycují prach, popel, pyl a další pevné částice, čímž snižují obsah těchto znečišťujících látek ve vdechovaném vzduchu. Mimo ekologické důvody má pěstování rostlin i dopad psychologický. Studie prokázaly, že rostliny na pracovišti a ve škole snižují stres zaměstnanců a studentů a mají příznivé účinky na zdraví, kupříkladu snižují stres a krevní tlak, uvolňují svalové napětí a navozují pozitivní pocity. [1]

V globálním měřítku jsou tedy rostliny pro člověka nezbytné z několika zásadních důvodů. Jedná se o již zmiňovanou produkci kyslíku a utilizaci oxidu uhličitého pomocí fotosyntézy. Další klíčovou schopností rostlin je zásah do potravního řetězce, živí totiž volně žijící živočichy a tisíce jejich druhů se pěstují pro lidskou potřebu. V případě přírodních katastrof jsou to právě rostliny, které obnovují úrodnost půdy uvolňováním živin a chrání před erozí. Jejich úkolem je také zachycování znečišťujících látek a čištění vody. Na nejdůležitějším místě stojí fakt, že právě rostlinná říše je jedním z nejširších a nejstarších zdrojů léčiv. [2]

Rostliny jsou s léčením spjaté od dávných časů. Lidstvo je v těsném kontaktu s prostředím, ve kterém žije, a čerpá z něj přísady. Léčebné účinky však nejdříve musely být objeveny, a to metodou pokusu a omylu. Vědomosti o léčivých rostlinách se předávaly z generace na generaci, než společně s vývojem společnosti získaly své hranice a pravidla. Bez rostlin by lidé, ani žádné jiné živé organismy, nefungovaly

takovým způsobem, jakým mají. V Číně, Řecku, Egyptě a Indii byla vegetace předmětem nejstarších vědních oborů, v jiných zemích se flóra užívala pro aromatické, dezinfekční a opojné účinky. Z rostlin mohou být využity různé části – semena, kořeny, listy, květy, plody nebo i celá těla. Zjistilo se, že tím, co z byliny dělá léčivou, je obsah účinné látky, která má terapeutické účinky. V současnosti, dle World Health Organisation (WHO), se více než 80 % populace stále častěji spoléhá na tradiční rostlinnou léčbu. [3]

Účinnou látkou pro člověka je sekundární metabolit (SM). [4] Jde o chemické sloučeniny, které jsou postradatelné pro základní životní funkce rostlin, jako je růst nebo rozmnožování, ale mohou hrát klíčovou roli při reakci na stresové situace, adaptaci na prostředí nebo při lákání opylovačů. Tyto bioaktivní složky spouští farmakologický nebo toxikologický efekt u živých organismů. [5]

## 2 Cíl práce

Tato diplomová práce je součástí širšího výzkumu rostlin čeledi Amaryllidaceae na Katedře farmakognosie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Cílem práce je:

1. Zpracování literatury, rešerše a seznámení s problematikou vybraných druhů rostlin čeledi Amaryllidaceae.
2. Převedení rostlinného materiálu na alkaloidní extrakty, provedení GC/MS analýzy a predikce obsažených alkaloidů.
3. Stanovení biologické aktivity extraktů vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase.
4. Zhodnocení výsledků a sepsání diplomové práce.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Čeleď Amaryllidaceae

Čeleď amarylkovitých (Amaryllidaceae) zahrnuje asi 80 rodů, jejichž 2500 druhů je rozšířeno v tropech a teplých oblastech mírného pásma. [6] Z podrobnějšího zeměpisného hlediska se rostlinám daří nejvíce v Jižní Americe, Středomoří a jižní Africe. [7] Rostliny čeledi Amaryllidaceae prosperují spíše v suchých oblastech ve společnosti trav a bylin, zřídka i v lesích. [8] Vůně květů jsou vysoce oceňovány v parfémovém průmyslu, naopak těkavé obsahové látky se užívají pro jejich odpuzující účinky v repelentech. [9]

Od první izolace lykorinu v roce 1877 bylo v průběhu následujících let získáno více než 500 alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (AA). Dle strukturních vlastností se obrovské množství rozmanitých alkaloidů této čeledi klasifikuje do různých skupin. Rozsáhlejší studie v poslední době odhalily, že AA vykazují širokou škálu bioaktivit, jako jsou bioaktivity protinádorové, antivirové, antibakteriální, antimykotické, antimalarické a analgetické. Byly také prokázány inhibiční a cytotoxické účinky vůči acetylcholinesterasám (AChE). [10]

#### 3.1.1 Taxonomická klasifikace Amaryllidaceae

Říše: rostliny (Plantae)

Podříše: cévnaté rostliny (Tracheophyta)

Oddělení: krytosemenné (Magnoliophyta)

Třída: jednoděložné (Liliopsida)

Řád: chřestotvaré (Asparagales)

Čeleď: amarylkovité (Amaryllidaceae) [15]

#### 3.1.2 Morfologie

Z pohledu morfologického se jedná o byliny s cibulemi nebo s oddenky. [11] Stonkem nejčastěji bývá stvol, který je zřídka olistěný. Listy jsou úzké se souběžnou žilnatinou. Dále jsou listy obecně charakterizovány jako střídavé, většinou bývají přisedlé a dvouřadé, velice vzácně jsou listy této čeledi řapíkaté. Květní lístky jsou uspořádány

ve dvou kruzích, z nichž každý kruh má 3 lístky. Plody jsou tobolky, v menší míře nažky nebo bobule. Z hlediska SM, kromě alkaloidů, které jsou pro amarylkovité stěžejní, mohou rostlinní zástupci obsahovat silice (např. rod *Allium* L.), [8] flavonoidy, [12] fenoly, lektiny, peptidy a další. [13]

### 3.1.3 Využití

Mnohé druhy čeledi Amaryllidaceae jsou ceněny pro své estetické kvality, například narcisy (rod *Narcissus* L.), sněženky (rod *Galanthus* L.) nebo bledule (rod *Leucojum* L.), jsou běžně pěstovány jako rostliny okrasné.

Vzhledem k jejich hojnému výskytu v jižní Africe a tamějším kulturním zvykům nachází amarylkovité využití v tradiční medicíně, současně patří mezi nejčastěji obchodované cibulovité rostliny. Přes 50 druhů je používáno lokálními kmeny k léčbě častých onemocnění: nachlazení, chřipky, poranění a infekce. Kromě těchto situací místní šamani zkoušejí účinnost rostlin i při závažných problémech, například při rakovině.

Informace získané z podobných domorodých vědomostí vedly k průlomovým objevům v oblasti farmacie. Význam čeledi Amaryllidaceae se pohybuje ve třech polích vědy, ve farmakologii, fytochemii a alternativní medicíně založené na důkazech. [14]

### 3.1.4 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

#### 3.1.4.1 Historie

Již ve 4. století před naším letopočtem Hippokratés z Kósu, [17] takzvaný otec moderní medicíny, [18] objevil přínos AA v používání oleje z rostliny *Narcissus poeticus* L. k léčbě nádorů dělohy. [17]

V roce 1877 se z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* L. izoloval první alkaloid zástupců amarylkovitých, lykorin. Dalším zkoumáním bylo objeveno celkem přes 350 alkaloidů různých struktur a biologických aktivit, toto číslo každoročně narůstá. [7]

#### 3.1.4.2 Účinky

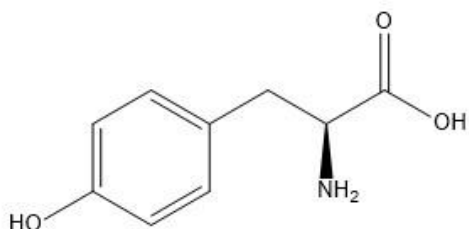
Čeleď Amaryllidaceae je jedna z dvaceti nejpoužívanějších pro své léčivé účinky. [13] AA mají schopnost působit proti nádorům, zánětům, bakteriím, virům, plísním, malárii,

depresi, přenosu bolesti a také proti aktivitě cholinesteras (ChE). [7] Zmíněné účinky vycházejí z biologických vlastností obsahových látek – isochinolinových alkaloidů. [14]

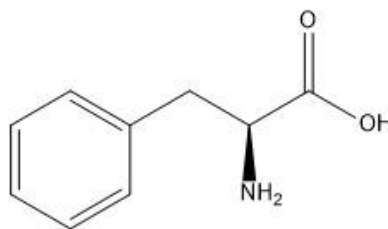
### 3.1.4.3 Obecná charakteristika struktury

Všechny druhy alkaloidů jsou nízkomolekulární sloučeniny s biologickou aktivitou. Základem jejich struktury je heterocyklus vycházející z aminokyselinového prekursoru, další nedílnou součástí je bazický dusík primárního, sekundárního či terciárního charakteru. Díky svým vlastnostem jsou jednou z nejdůležitějších skupin SM vyšších rostlin na poli farmakologie.

Od jiných skupin alkaloidů se amarylkovité liší strukturním skeletem a biologickými účinky. AA, stejně jako ostatní isochinolinové alkaloidy, jsou odvozené od aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu. [16]



Obrázek 2 – L-tyrosin

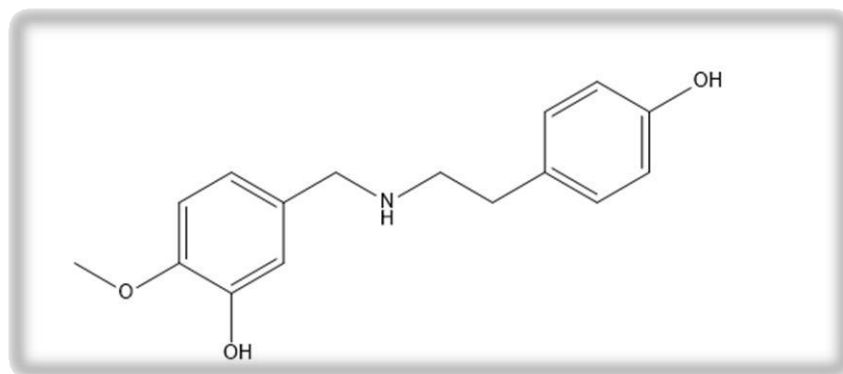


Obrázek 1 – L-fenylalanin

### 3.1.4.4 Základní biosyntéza

Existuje několik různých syntetických procesů vedoucích k formování alkaloidů z fenylalaninu a tyrosinu, AA vznikají cestou norbelladinovou. Spojením L-fenylalaninu a L-tyrosinu vznikne sloučenina 4'-O-methylnorbelladin, jde o základní stavební kámen pro syntézu všech typů AA. Záleží potom na navázání dalších sloučenin a rozlišení, zda se jedná o vazbu *para-para'*, *ortho-para'* nebo *para-ortho'*. [16]





**Obrázek 3 – 4'-O-methylnorbelladin**

Alkaloidy obsahující ve své struktuře norbelladinový skelet jsou téměř exkluzivně izolovány v čeledi Amaryllidaceae. Podle chemické struktury se skupina AA rozřazuje přibližně do čtrnácti typů, [7] většina sloučenin se ale vměstná do základních devíti. [19]

#### **3.1.4.5 Typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae**

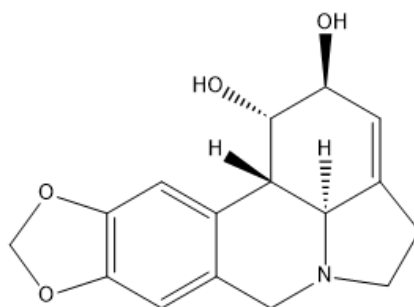
Jak bylo již zmíněno, skupiny AA se rozlišují typem intramolekulárního oxidativního propojení. *Ortho-para'* fenolové spojení má za následek formování struktury lykorinového typu, ze kterého dalšími obměnami vzniká homolykorinový typ. *Para-para'* spojení vede ke vzniku typu krininu, haemanthaminu, tazettinu, narciclasinu a montaninu. Galanthaminový strukturní typ je jediný, který začíná vazbou *para-ortho'*. Novější strukturní typy, například gracilinový či plicaminový, jsou deriváty již popsáných strukturních skupin.

Kromě typických alkaloidních druhů pro čeleď Amaryllidaceae se v jejich strukturních základech objevují i sloučeniny z čeledí jiných. Benzyltetrahydroisochinolinový a aporfinový typ byly nalezeny v *Galanthus trojanus* A.P.Davis & Özhatay, přestože jsou nejčastěji spojovány s čeleděmi Papaveraceae a Fumariaceae. Typaminové protoalkaloidy, které jsou biosyntetizovány v Poaceae a Cactaceae, byly objeveny v druzích *Galanthus* a *Leucojum*. Je však třeba zmínit, že všechny tyto neobvyklé alkaloidy byly izolovány společně s typickými AA. [19]

### Lykorinový typ

Lykorinové alkaloidy představují nejrozšířenější a nejznámější skupinu AA. Předním zástupcem je lykorin, obvykle obsažený v listech a cibulích všech Amaryllidaceae rostlin. [20] Lykorin byl poprvé izolován v roce 1877 z *Narcissus pseudonarcissus*, stal se tak prvním objeveným alkaloidem amarylkovitých. Jeho struktura, pyrrolfenanthridinový skelet, byla však objasněna až v roce 1956. [21] Kromě lykorinu se ve skupině nachází další podobné struktury: dihydrolykorin, pseudolykorin, galanthin či hippamin. [22]

Lykorin má výborné biologické vlastnosti, vyniká především svou cytotoxicitou, a to spuštěním apoptózy u nádorových buněk. Dále funguje jako antivirotikum a antimykotikum. [20]

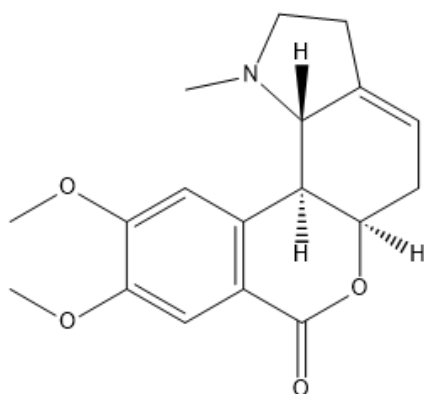


Obrázek 4 – Lykorin

### Homolykorinový typ

Předními zástupci této skupiny jsou homolykorin, lykorenin, 8-O-dimethylhomolykorin a hippeastrin. [21] Alkaloidy tohoto typu byly opět nalezeny téměř ve všech rodech amarylkovitých. [23] Strukturálním základem je 2-benzopyrano-[3,4-g]indol. [21]

Na rozdíl od jiných typů AA je bioaktivita většiny sloučenin homolykorinového typu z velké části neznámá, některé však vykazují funkci cytotoxickou, analgetickou, antivirovou a antimykotickou. [23] Problém cytotoxické aktivity ale je, že působí zhoubně i na buňky zdravé. Nejpříznivěji se ukazuje hippeastrin, jehož antimykotický účinek je pozorován vůči *Candida albicans* a účinek antivirový proti *Herpes simplex*. [21]

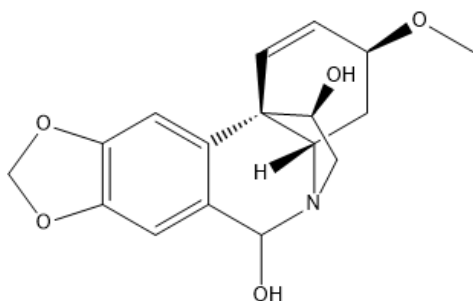


**Obrázek 5 - Homolykorin**

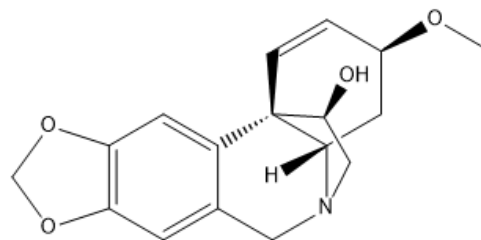
### Haemanthaminový typ

Alkaloidy haemanthaminového typu vycházejí ze struktury 5,10b-ethanofenanthridinu. Nejvýraznějším zástupcem skupiny je haemanthamin a haemanthidin, haemanthidin se nachází v rostlinách ve výrazně nižší koncentraci. Haemanthamin může být izolován dokonce v gramových množstvích.

Tento typ AA získal patřičnou pozornost, když byly objeveny jeho protinádorové vlastnosti. Oba alkaloidy vykazují mimo jiné antiproliferativní a cytotoxickou aktivitu, zejména haemanthamin se ukázal jako účinný například proti karcinomu děložního čípku, akutní lymfoblastické leukémii či proti karcinomu prsu. [24] Haemanthidin naproti tomu vyniká protizánětlivými a analgetickými účinky, které jsou výraznější než u kyseliny salicylové. [21]



**Obrázek 7 - Haemathidin**

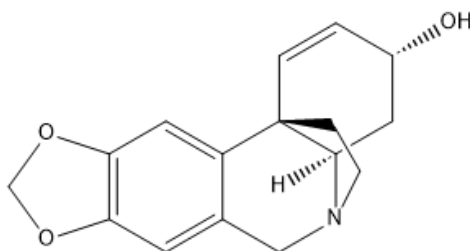


**Obrázek 6 - Haemanthamin**

### Krininový typ

Krininový typ je také charakterizován strukturou ethanofenanthridinu. Vedoucími sloučeninami jsou krinin, bulbispermin, buphanisin a flexinin, mezi jejichž přední biologické účinky se řadí imunostimulace, cytotoxicita, antimalarická a anticholinergní aktivita. [25]

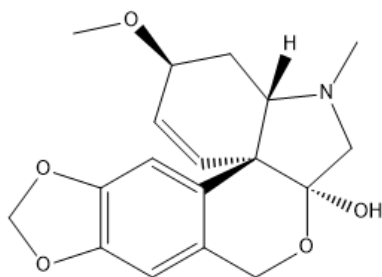
Cytotoxické vlastnosti jsou způsobeny cílením na cytoskelet aktinu v nádorových buňkách. Krininové alkaloidy jsou proto uváděny jako potenciální pro léčbu různých forem rakoviny, které jsou rezistentní k apoptóze, například glioblastom. [17] Glioblastom je mozkový nádor, jenž se řadí mezi nejagresivnější a je velmi častý. [26] Zejména alkaloid bulbispermin z *Crinum bulbispermum* (Burm.f.) Milne-Redh. & Schweick. inhibuje proliferaci buněk glioblastomu. Na oblastech, které mohou indukovat cytostatický efekt, působí i další AA, narciklasin a lykorin. [17]



Obrázek 8 – Krinin

### Tazettinový typ

Tazettinovému typu AA s výchozí strukturou 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu dominuje derivát tazettin, biologicky aktivnějším je však jeho biosyntetický prekurzor pretazettin. [21] Přestože jsou tazettinové alkaloidy často zastíněny sloučeninami známějšími, například typy lykorinu či krininu, je postupně odkrýváno i jejich protirakovinný potenciál. [27] Cytotoxická aktivita je významná zejména na T-lymfocytární buňky, dále proti aktivitě P-glykoproteinu a inhibuje funkci RNA-dependentní DNA polymerasy. [21] Představují možnou léčbu leukemie, adenokarcinomu, lymfomu a glioblastomu. [27]

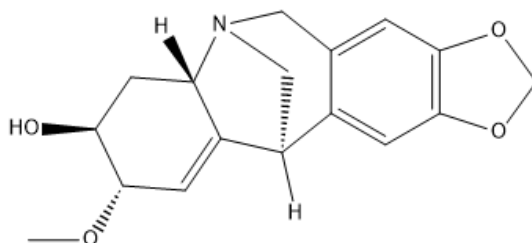


**Obrázek 9 – Tazettin**

### Montaninový typ

V porovnání s ostatními typy AA jsou alkaloidy montaninového typu zastoupeny v rostlinách v nižších koncentracích, jejich biologické vlastnosti jsou však přesto významné. Mezi hlavní zástupce se řadí montanin, pancracin, [28] manthin, manthidin, coccinin [29] a jiné, které sdílejí 5,11-methanomorfanthridinové jádro.

Bylo zjištěno, že skupina má silný inhibiční efekt na růst různorodých rakovinných buněčných linií. Mezi jejich další schopnosti patří účinek anxiolytický, antidepresivní a antikonvulzivní. Sám montanin byl zkoumán pro svoji schopnost inhibovat AChE, působit protirevmaticky, antibakteriálně a antimykoticky. Zajímavé je, že alkaloidy montaninového typu lze snadno získat i z alkaloidů s haemanthaminovou strukturou, jejichž rostliny jsou běžnější a dostupnější. [28]



**Obrázek 10 – Montanin**

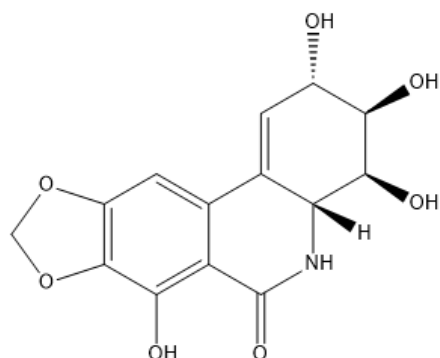
### Narciklasinový typ

Typ narciklasinový (či pankratistatinový) strukturně vychází z fenanthridinového jádra. Vedoucí látky, narciklasin a pankratistatin, se uvádí jako nejslibnější AA na poli léčby nádorů. Obsahové látky narciklasinového – pankratistatinového typu AA účinkují navíc baktericidně, antifungálně a antivirotický. [30]

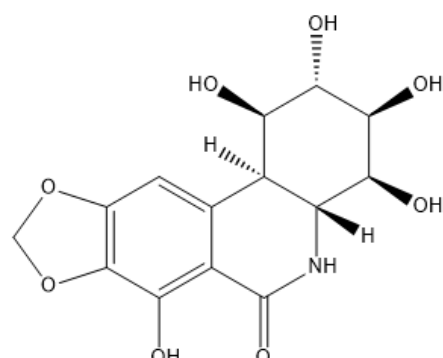
Narciklasin, izolovaný z rodu *Narcissus*, [21] má velmi dobrou účinnost například na nádory mozku. Tato skutečnost vychází ze schopnosti narciklasinu inhibovat buněčný růstablokováním proteinové biosyntézy. [30] Váže se na ribozomální podjednotku 60S, čímž zastavuje působení peptidyltransferasy, a znemožňuje tak formování peptidové vazby v dalších tvořících se proteinech. Také účinkuje apopticky na buňky adenokarcinomu prsu a karcinomu prostaty. Velkou výhodou narciklasinu je jeho mnohonásobně vyšší účinnost na buňky nádoru než na buňky lidské. [21] Narciklasin má natolik silný inhibiční efekt, že může být použit jak proti rakovině, tak jako růstový regulátor rostlin. [13] Vedle své protinádorové aktivity má narciklasin i funkci protizánětlivou. V různých situacích potlačuje prozánětlivý faktor TNF- $\alpha$ , dokáže dokonce redukovat destrukci kloubů při revmatoidní artritidě. Mezi méně významné farmakologické účinky narciklasinu se řadí aktivita antivirová a jeho pozitivní vliv na kognitivní funkce. [30]

Pankratistatin, objevený v cibuli *Hymenocallis littoralis* Salisb., má také vysokou antineoplastickou funkci. [21] Biochemické studie ukazují, že může selektivně indukovat apoptózu pouze v rakovinných buňkách bez toho, aby se choval cytotoxicky k buňkám zdravým. [13] Výborně cílí například na buňky leukemie, apoptózou selektivně likviduje pouze leukemické buňky, a to již po dvou dnech. [21]

Přestože mají pancratistatin i narciklasin slibnou antineoplastickou aktivitu, v cibulích se nacházejí ve velice nízkých koncentracích a jejich izolace je finančně velice náročná. Proto byla vyvinuta snaha o chemickou syntézu, která však také nevedla k pozitivním výsledkům, protože se obvykle skládá z příliš mnoha kroků, což výrazně omezuje jejich terapeutické využití. Alternativní strategií by mohlo být vylepšení přirozených schopností rostlin *Hymenocallis sp.* Salisb., aby produkovaly tyto bioaktivní alkaloidy pomocí rostlinných tkáňových kultur. [13]



Obrázek 11 - Narciklasin

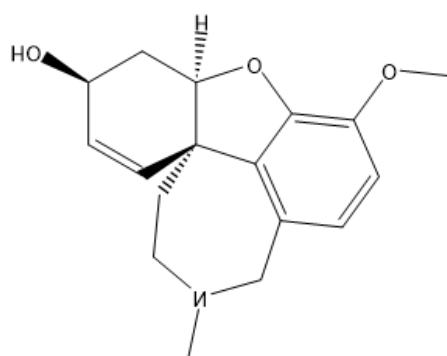


Obrázek 12 – Pankratistatin

### Galanthaminový typ

Základním rysem pro tento typ AA je přítomnost dibenzofuranu. Alkaloid galanthamin je pro galanthaminový typ vedoucí sloučeninou, poprvé byl izolován z cibule *Galanthus woronowii* Losinsk. [21] Galanthamin je také možné izolovat z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* a *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb., listů *Leucojum aestivum* L. nebo jej lze vyrobit synteticky. [31] V současnosti se jedná o jeden z nejdůležitějších alkaloidů využívaných v medicíně, i když byl jeho efekt objeven víceméně náhodou až v 50. letech 20. století.

Jeho fyziologický účinek spočívá ve schopnosti inhibice acetylcholinesterasy, což se hojně využívá na poli neurologie. [21] Konkrétně je galanthamin dlouho působící, selektivní, reversibilní a kompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy (AChEi). Bývá poměrně dobře tolerován, až na možné cholinergní vedlejší účinky. [32] Jeho aktivita je vhodná pro experimentální použití při neurologických poruchách (myasthenia gravis, dětská obrna, poliomyelitida), léčbu demence a Alzheimerovy choroby. Galanthamin zlepšuje kognitivní funkce, výhodou je také výrazně vyšší selektivita k AChE než k butyrylcholinesterase (BuChE). Na rozdíl od mnoha jiných AA galanthamin nevykazuje žádnou cytotoxickou aktivitu. [21]

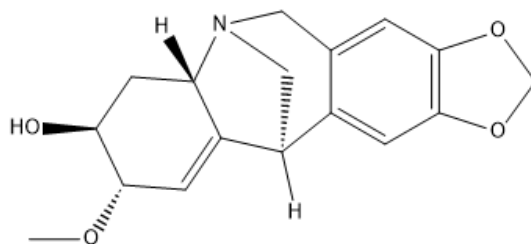


Obrázek 13 – Galanthamin

### Belladinový typ

Kromě belladinu, který je strukturním základem, se do této skupiny řadí norbelladin a *O*-methylbelladin, většina zástupců bývá izolována z rodu *Nerine* Herb. Tito zástupci nevykazují žádnou výjimečnou inhibiční aktivitu vůči AChE či BuChE. [33]

Do skupiny patří i nově objevené alkaloidy pocházející z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, které naopak zmíněné enzymy inhibují. Jedná se o alkaloidy nazvané carltonin A-C, jež jsou považované jako velmi slibné kandidáty pro léčbu Alzheimerovy choroby. [34]



Obrázek 14 – Belladin



## 3.2 Zkoumané druhy rostlin Amaryllidaceae

### 3.2.1 *Crinum erubescens* L.f.

Rod *Crinum* L., se svými více než 100 druhy globálně, je z čeledi Amaryllidaceae tím nejrozšířenějším. Velmi častým druhem je *Crinum bulbispermum* (Burm.f.) Milne-Redh. & Schweick., jehož odvary jsou užívány v tradiční medicíně po celé jižní Africe proti více než 20 zdravotním problémům. V látkách obsažených v kořenových a cibulových extraktech byly objeveny schopnosti významně inhibovat AChE. Dalšími zástupci jsou *C. macowanii* Baker, *C. delagoense* (L.Verd.) Kwembeya & Nordal, *C. moorei* Hook.f., [14] *C. jagus* (J.Thomps.) Dandy, *C. glaucum* A.Chev. a další. Cibule posledních dvou zmíněných se užívají v tradiční medicíně v Nigérii proti ztrátě paměti a dalším příznakům spojeným se stárnutím. Alkaloidní extrakty obou ukázaly inhibici AChE, z nichž neaktivnějšími látkami jsou hamayne a lykorin. [35] Další extrakty druhu *Crinum* byly testovány pro svou antinociceptivní schopnost. Výsledky ukázaly, že je aktivita zprostředkována jak spinálně, tak superspinálně. Navíc jsou extrakty efektivní proti zánětlivé i nezápětlivé bolesti. [13]

*Crinum erubescens*, křín, se vyskytuje na mokřadních stanovištích Střední a Jižní Ameriky. Květy jsou načervenalé až bílé, zatímco tyčinky mají odstín červené tmavší, až fialový. Většinou se pěstuje jako okrasná rostlina. [11] Z obsahového hlediska se v *Crinum erubescens* nacházejí alkaloidy macronin, crinamin, 1-epidemethoxybowdensin, bowdensin, ismin a další. [36] U extraktu z *Crinum erubescens* ex Aiton byla prokázána silná aktivita proti malárii a antiproliferativní aktivita k buněčné linii rakoviny vaječníků. [37]



Obrázek 15 – *Crinum erubescens* [38]

### 3.2.2 *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Voss

*Hippeastrum puniceum* se jako většina amarylkovitých nejčastěji objevuje v Jižní Americe, [40] konkrétně v Brazílii. Rod *Hippeastrum* Herb., hvězdník, obsahuje zástupce všech typů AA. Fytochemické zkoumání rodu začalo už v roce 1950. První studie se zabývaly výzkumem na *H. vittatum* (L'Hér.) Herb., při čemž byly popsány alkaloidy tazettin a lycorin. Následně byly izolovány další alkaloidy – haemanthamin, homolykorin, hippeastrin a vittatin. Kromě *H. vittatum* byly analyzovány i jiné druhy, z nichž se získávaly další alkaloidy. *H. rutilum* (Lam.) H.E.Moore kupříkladu obsahuje galanthamin, v *H. aulicum* Herb. se nachází montanin a v *H. puniceum* byl nalezen 3-*O*-acetylnarcissidin. [19]

Rod *Hippeastrum* je považován za zdroj nových chemických látek. [41] Velmi efektivním způsobem identifikace komplexních směsí se ukázala technika GC-MS, tedy kombinace plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS). Vysoká rozlišovací schopnost použitého MS detektoru v kombinaci s dobrou dostupností jednotlivých spekter v literatuře dovolují identifikaci AA, v kombinaci s vhodnou metodou v rámci GC i jejich kvantifikaci. I přesto jsou tyto výsledky poněkud kontroverzní a nemůžeme se na ně dostatečně spolehnout, protože v rámci těchto

analýz mohou vznikat artefakty či nemusí dojít ke správné identifikaci. GC-MS analýza vede pouze k predikci jednotlivých alkaloidních látek či strukturních typů alkaloidů.

V poslední dekádě se většina studií soustředí na biologickou aktivitu. [19] Pozorování rodu ucelilo vnímání AA jako látky cytotoxické, antiprotozoické a schopné inhibovat AChE. [41]

*Hippeastrum puniceum* má střapaté bazální listy, stvol dorůstá až jednoho metru a na jeho konci roste několik květů. Květy mají trychtýřovitý tvar a šest zářivě červených okvětních lístků, které se směrem k základně mění v zelené. Často se používá jako okrasná rostlina, v některých zemích se kultivuje pro účely medicíny. [40] V *H. puniceum* byla identifikována řada alkaloidů, na předních přičkách se pohybuje lykorin, pseudolykorin, pancratinin C či 11-hydroxyvittatine. Nalezené alkaloidy, lykorin a tazettin, mají inhibiční potenciál k AChE. [42]



Obrázek 16 – *Hippeastrum puniceum* [43]

### 3.2.3 *Hippeastrum striatum* (Lam.) H.E.Moore

Český název pro rostlinu *Hippeastrum striatum* je hvězdník. S hvězdníkem je možné se setkat na Havajských ostrovech, jeho hlavním útočištěm je ale východní Brazílie. Je mu dobře v deštných lesích a mokřem prostředí. Jednoduše se šíří díky množství vyprodukovaných cibulí, které se uvolní od mateřské rostliny. Okvětní lístky mají výrazné oranžovočervené zbarvení, směrem do středu květu se barva mění na světle zelenou. [44]



Obrázek 17 – *Hippeastrum striatum* [45]

#### 3.2.4 *Hymenocallis occidentalis* (Leconte) Kunth

Nejvyšší počet druhů *Hymenocallis* Salisb. roste v Mexiku a okolních zemích. Květy jsou elegantně trubkovité, sněhově bílé a příjemně voní. Tyčinky mají tvar výrazné koruny

a dlouhých úzkých okvětních lístků, které rostlině propůjčují typický pavoučí vzhled, kvůli němuž rostlina získala přezdívku pavoučí lilie. Díky vůni a vzhledu jsou častou volbou při výběru okrasných květin. Kromě *H. occidentalis* existují druhy nazvané *H. littoralis* Salisb., *H. caribaea* Herb., *H. rotata* (Ker Gawl.) Herb. Tyto rostliny produkují alkaloidy pseudolykorin, hippeastrin, lykorin, pancratistatin a jiné, všechny s sebou nesou své již zmiňované účinky. Například tedy schopnost cytotoxickou, analgetickou, antivirovou či antimalarickou. [46]

Zástupci *Hymenocallis occidentalis* rostou především ve volné přírodě na jihu USA, navzdory své atraktivitě se v zahradnictví ale tolik nepěstují. Na rozdíl od jiných druhů *Hymenocallis* roste *H. occidentalis* obvykle v horských lesích s tvrdým dřevem, někdy i daleko od vod. [47]



Obrázek 18 – *Hymenocallis occidentalis* [47]

### 3.3 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

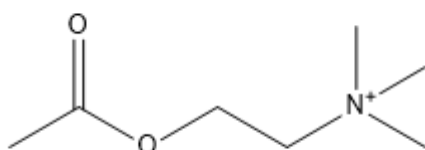
#### 3.3.1 Neurotransmise

Neurotransmitery (NT) jsou chemičtí poslové zodpovědní za přenos signálů mezi neurony, signál jde přes synapse z neuronů do efektorových buněk. Jedná se tedy o transfer signálu z jedné buňky (presynaptické) do buňky druhé (postsynaptické). NT jsou obvykle produkovány v nervových buňkách, ze kterých se mohou uvolňovat díky depolarizaci buněčné membrány a exocytóze závislé na vápníku. Kromě acetylcholinu (ACh) se mezi NT řadí dopamin, serotonin, glutamát a kyselina  $\gamma$ -aminomáselná. [48]

#### 3.3.2 Acetylcholin

ACh je neurotransmitter, [49] tedy přenašeč. V tomto případě hlavní přenašeč cholinergního systému. Životní cyklus ACh počíná jeho syntézou v nervových zakončeních, která je založená na reakci mezi acetylkoenzymem A a cholinem. [48] Tato reakce je katalyzovaná enzymem cholin acetyltransferasa, jehož přítomnost značí, že daný neuron je cholinergní. Většina ACh v nervových zakončeních je uschována ve vesikulech, malé množství se pohybuje i volně v cytosolu. Záchyt ACh do zásobního vesikulu probíhá prostřednictvím energeticky závislé pumpy. Během neurotransmise se ACh uvolňuje z nervového zakončení do synaptické štěrbině, váže se na receptory (nikotinové a muskarinní) na postsynaptické membráně a přenáší tak signál. [49]

Po uvolnění a vyvolání účinku v synapsích jsou molekuly ACh hydrolyzovány AChE, [48] která se také nachází na postsynaptické membráně, a tím ukončí se přenos signálu. Tato reakce je nezbytná k tomu, aby se cholinergní neuron po aktivaci vrátil do klidového stavu. Uvolněný cholin z ACh je opět vychytáván presynaptickým nervem a nový neurotransmitter je syntetizován spojením s acetylkoenzymem A za pomoci cholin acetyltransferasy. [49]



**Obrázek 19 – Acetylcholin**

ACh je hlavním efektoem autonomního nervového systému, funguje jak v sympatických, tak parasympatických vláknech. Mimo jiné ovlivňuje sekreci slin, mléka, potu nebo slz. Reguluje srdeční stahy, krevní tlak, je zodpovědný za kontrakci střevních svalů, tedy i za pohyb ve střevech. Řídí uvolňování moči, způsobuje erekci a stahuje kosterní svaly. Prostřednictvím uvolňování adrenalinu a noradrenalinu z nadledvinek aktivuje sympatický systém. [48] ACh hraje významnou roli v kognitivních funkcích, které představují učení a schopnost si pamatovat informace a jména. Studie také prokazují jeho účast při detekci podnětů a udržení pozornosti. [50]

Význam cholinergního systému podporuje skutečnost, že poruchy korové cholinergní inervace jsou úzce spojeny s demencí u Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Bylo prokázáno, že cholinergní neurony, které podléhají mírným změnám souvisejícím s věkem, mají za následek cholinergní hypofunkce, čímž vzniká deficit paměti a nastupuje demence. Nedostatek ACh se projevuje i poruchou spánku, což může vést ke zhoršení paměti a následně poklesu koncentrace. [48]

### **3.3.3 Cholinesterasy**

Jde o rodinu enzymů, jejichž funkcí je katalyzovat hydrolýzu – rozklad. [49] AChE a BuChE jsou členy skupiny B-estaras, která je strukturně a funkčně charakterizována

jako serinové hydrolasy. Nacházejí se v krevní plazmě. [51] Cholinesterasy patří mezi nejefektivnější známé enzymy. [52]

### **3.3.3.1 Acetylcholinesterasa**

AChE je cholinergní enzym, který se primárně nachází v postsynaptických nervosvalových spojích a vodivých tkáních, především ve svalech a nervech. Primární role AChE je ukončit neuronální přenos a signalizaci mezi synapsemi, aby se zabránilo šíření ACh a aktivaci blízkých receptorů. Dosahuje toho okamžitým rozkladem ACh na cholin a kyselinu octovou. [53] . AChE má vysokou katalytickou aktivitu, každá molekula rozloží asi 25000 molekul ACh za sekundu, což se blíží rychlosti difuzně řízené reakce. [49] Přestože je základní funkcí AChE ukončovat neuronální přenos, bylo zjištěno, že hraje roli i při nervovém vývoji embrya. [53]

### **3.3.3.2 Butyrylcholinesterasa**

BuChE je syntetizována v játrech. Jde o sesterský enzym AChE, která pochází z nervového systému, konkrétně z neuronů. Na rozdíl od AChE, jejíž funkce je specifická a velmi dobře definovaná, jsou schopnosti BuChE stále objevovány a zkoumány. [54] Vyskytuje se poměrně hojně v plazmě a dokáže rozkládat velké množství sloučenin obsahujících estery. Tato skutečnost je zásadní zejména pro obory farmakologie a toxikologie. [52]

BuChE se nachází především na periférii, při patologických stavech se ale její koncentrace zvyšuje i v mozku. Má roli v neurotransmisi a detoxifikaci, avšak jedinci s nedostatkem tohoto enzymu se nejeví jako asymptomatictí. Proto se také v začátcích výzkumů počítalo s faktem, že je BuChE nefunkční. [54] Bylo naopak zjištěno, že má vliv na metabolismus léčiv, lipidů a jejím působením dochází k hydrolýze toxických esterů, jako je například kokain, organofosátové pesticidy a nervově paralytické látky. [52] Potenciální terapeutické využití BuChE je tedy prevence toxicity nervově paralytických látek. Rekombinantní mutace BuChE, která rychle inaktivuje kokain, je vyvíjena jako léčebný prostředek sloužící k pomoci vyléčeným závislým na kokainu vyvarovat se opětovného užívání drog. [55]

### 3.3.4 Inhibitory acetylcholinesterasy

V roce 1990 se AChEi poprvé ukázaly jako prospěšné při léčbě AD. Inhibice AChE vede totiž ke sníženému odbourávání ACh a díky tomu k jeho následné akumulaci, [53] zvýšení hladiny tohoto NT a prodloužení délky trvání jeho účinku. [49] Takto vytvořený nadbytek ACh zvyšuje stimulaci muskarinových a nikotinových receptorů, což přináší určitou terapeutickou úlevu při poruchách paměti u AD. [53]

Podle druhu účinku se inhibitory AChE dělí do dvou skupin – reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní inhibitory mají terapeutické využití, zatímco ireverzibilní skupina je spojená s toxickými účinky. [49] Ireverzibilní AChEi mohou fungovat velmi toxicky kvůli tomu, že způsobují cholinergní krizi na různých skupinách receptorů. Na muskarinických receptorech mohou vyvolat efekty jako je mióza, zvýšená sekrece (slinění, slzení, pocení), průjem, močení. Druhý typ skupiny cholinergních receptorů, nikotinový, má za následek záškuby svalových vláken a neurosvalovou blokádu. [53]

V praxi používané látky první volby při léčbě AD se nazývají donepezil a rivastigmin. Jde o účinné reverzibilní AChEi s dobrým průnikem přes hematoencefalickou bariéru. U osob léčených AChEi bylo zaznamenáno zpomalení progresu onemocnění a také zvýšení pozornosti. Žádné látky však nejsou bez rizika, AChEi musí být v budoucnu ještě prověřovány pro svoji možnou neurotoxicitu při akumulaci. [53]

Čeleď Amaryllidaceae hraje velmi významnou roli v terapii AD. Kolem roku 1950 se začaly objevovat studie zmiňující léčbu poliomyelitidy odvarem ze sněženky (*Galanthus woronowii*) či četná řešení příznaků myalgie třením sněženky o čelo nemocného. Následně byly prováděny první studie, které prokázaly schopnost galanthaminu inhibovat AChE. Později, kolem roku 1990, bylo zjištěno, že kromě mírnění svalové slabosti, dystrofie nebo zánětů nervů galanthamin může být použit v symptomatické léčbě AD. [56] Vzhledem k jeho nedostatečné přírodní produkci se objevují stále nové přístupy ke kompletní syntéze. Vedle galanthaminu se často syntetizuje i jeho prekurzor, narwedín. [57]

### 3.3.5 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejznámější formou demence. Popsal ji v roce 1906 německý psychiatr Alois Alzheimer na pacientce, se kterou se setkal už o pět let dříve.



V pětiletém mezidobí zkoumal její případ a odlišnosti od obvyklé demence a došel k závěru, že se jedná o novou chorobu vedoucí k neurodegeneraci. [56]

Jde o progresivní neurologickou poruchu [49] způsobenou úbytkem cholinergních neuronů [53] a snížením hladin ACh. [49] Z histologického úhlu pohledu přerušují  $\beta$ -amyloidní plaky a neurofibrilární spleti synaptickou signalizaci, což vede k odumírání neuronů. [53] Z patologického hlediska dochází k nesprávnému štěpení amyloidového prekursorového proteinu (APP) a tvorbě  $\beta$ -amyloidových extracelulárních ložisek. Současně se ve fibrilárních spletech chybně agreguje hyperfosforylovaný tau protein. Sníží se tak synaptická síla a dojde ke ztrátě synaptických funkcí, což má za následek degeneraci. [58]

V průběhu posledního století se choroba dále zkoumala, přesná příčina jejího vzniku stále známá není, podstata ale zůstává stejná od roku 1906. Existují tedy dvě určující patologie,  $\beta$ -amyloidní peptid v placích v šedé hmotě mozkové a hyperfosforylovaný tau protein v neurofibrilárních spletech. Doktor Alzheimer popsal chorobu čistě kvalitativně, ale od poloviny 80. let 20. století byly patologie už přesněji identifikovány a klinicky diagnostikovány. Klinicky se AD projevuje ztrátou synaptické plasticity i synapsí samotných, což úzce souvisí s úbytkem kognitivních funkcí. [58]

Výskyt choroby může souviset s životním stylem nebo genetickou výbavou, rozvoj AD závisí dokonce z 60–80 % na dědičných faktorech. [59] Může za to přítomnost genu kódujícího apolipoprotein E (APOE), tento gen je zapojen do tvorby proteinu, který pomáhá roznášet cholesterol a jiné typy tuku do krevního řečiště. [60] Celkem 23 genetických variant APOE genu je spojováno s AD. [61] Alela, která je nejvíce zodpovědná za dědičnost choroby, je APOE  $\epsilon$ 4. Ještě další dvě formy jsou prokazatelně důležité, jde o APOE  $\epsilon$ 2, která naopak poskytuje určitou ochranu před onemocněním, a APOE  $\epsilon$ 3 s dopadem víceméně neutrálním. [60] Přítomnost APOE  $\epsilon$ 4 3x–4x zvyšuje riziko rozvoje AD. [59]

Vedle APOE existují ještě tři další genetické varianty, které mají vliv na výskyt AD u mladších generací. Jde o geny kódující APP na chromozomu 21, presenilin (PSEN) 1 na chromozomu 14 a PSEN 2 na chromozomu 1. Pokud rodič nese genetickou variantu pro jeden z těchto genů, jeho potomek má 50% riziko, že se u něj projeví takzvaná časná

forma familiární AD. Genetické testování na přítomnost genů podmiňujících vznik AD se rutinně neprovádí, v určitých případech je však vhodné. [60]

Rizikovým faktorem pro onemocnění je vysoký věk – nemoc obvykle postihne osoby starší 65 let. Dále je nebezpečím přítomnost alespoň jedné APOE alely, ženské pohlaví a současná kardiovaskulární onemocnění. [59] V průběhu 15–25 let od propuknutí choroby může být AD přítomná bez jakýchkoli symptomů ve fázi mírné kognitivní poruchy, tento stav většinou ústí do demence. Je to následek dlouhodobé přítomnosti patologie AD. [59] Onemocnění provází i metabolické a zánětlivé změny. [58]

Choroba je popisována jako kognitivní porucha [53] charakterizovaná ztrátou paměti, poznávání a dalších intelektuálních schopností, které jsou natolik závažné, že narušují běžný život. [49] AD není vždy jednoduché odlišit od jiných nemocí, pokud projevy nezačínají ztrátou paměti. V brzkých fázích může mít pacient například problémy s hledáním slov či porozuměním vět, komplexní péče pak zahrnuje i návštěvy logopeda. [59] AD má do budoucna velmi špatnou prognózu, neexistuje na ni žádný lék a končí smrtí. [59] Zmírňují se pouze příznaky související s pamětí, myšlením, jazykem, úsudkem a podobnými procesy. [49] Hlavním terapeutickým cílem ve strategiích léčby AD je inhibice mozkové AChE, reverzibilní inhibitory však léčí pouze symptomy a zpomalují progresi onemocnění. [49] O tom, který specifický AChEi vybrat, rozhoduje profil vedlejších účinků. [58]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Potřeby

#### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

Tabulka 1 – Přehled rozpouštědel a chemikálií

Název	Vzorec/zkratka	Výrobce
Diethylether p. a.	Et <sub>2</sub> O	Penta a.s., Praha
Destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	Katedra analytické chemie
Ethanol 95%	EtOH	Penta a.s., Praha
Ethylacetát p. a.	EtOAc	LACH-Ner, s. r. o.
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Penta a.s., Praha
Kyselina chlorovodíková 2%	HCl	Penta a.s., Praha
Síran sodný bezvodý	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LACH-Ner, s. r. o.
Uhličitan sodný 10% roztok	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Penta a.s., Praha

#### 4.1.2 Detekční činidla

##### Dragendorffovo činidlo

Příprava

- Roztok A – rozpustí se 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- Roztok B – rozpustí se 32 g jodidu draselného v 80 ml vody.
- Zásobní roztok – roztok A a roztok B se v poměru 1:1 smísí, je třeba ho uchovávat v lednici při 4 °C.
- Detekční činidlo – 50 ml roztoku 20% kyseliny vinné se přidá k 5 ml zásobního roztoku. Detekční činidlo má stejná pravidla uchování jako zásobní roztok.

#### 4.1.3 Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Heidolph – Hei-VAP Advantega (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10 P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Analytické váhy KERN ABJ (KERN & SOHN GmbH)

- Analytické váhy Extend SARTORIUS
- UV lampa CAMAG
- GC-MS analýza
  - Plynový chromatograf 7890A GC (System Agilent Technologies)
  - Hmotnostní spektrometr 5975 GC/MSD (Systém Agilent Technologies)

#### 4.1.4 Databáze použité k vyhodnocení výsledků

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

#### 4.1.5 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

Mobilní směsi použité pro porovnání obsahu alkaloidních látek jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

**Tabulka 2 – První vytvářecí soustava**

<b>Směs rozpouštědel</b>	Benzín	Acetonitril	Isopropylalkohol
<b>Poměry</b>	25	5	15

**Tabulka 3 – Druhá vytvářecí soustava**

<b>Směs rozpouštědel</b>	Toluen	Diethylamin
<b>Poměry</b>	9	1

#### 4.1.6 Chromatografické adsorbenty

Chromatografickým adsorbentem je TLC silikagel 60 F<sub>254</sub>, který je rozprostřený na hliníkové podložce o velikosti 20×20 cm.

#### 4.1.7 Rostlinný materiál

K účelu této diplomové práce byly použity cibule čtyř druhů rostlin čeledi Amaryllidaceae. Cibule byly poskytnuty firmou Amazon Herbs ze Surinamu. Jde o cibule druhů *Crinum erubescens* (AL-751), *Hippeastrum puniceum* (AL-752), *Hippeastrum striatum* (AL-753) a *Hymenocallis occidentalis* (AL-754). Verifikace proběhla na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Dokladné vzorky rostlin jsou uloženy na Zahradě léčivých rostlin v Hradci Králové.

## 4.2 Všeobecné postupy

### 4.2.1 Příprava alkaloidních extraktů

Cibule zkoumané rostliny byly rozsekány v mixéru na malé kousky, přililo se k nim 250 ml EtOH a daly se vařit na vodní lázeň pod zpětným chladičem. Kousky cibulí a EtOH se po ochlazení přefiltrovaly přes vlizelín. Vaření cibulí s EtOH se provedlo celkem 3×, každé po dobu 20 minut. Takto vytvořené ethanolové extrakty se spojily a daly odpařovat na vakuovou odparku.

Vzniklé odpařené vzorky se okyselily 2% HCl na pH 1-2 a rozpustily. Pokud došlo během rozpouštění k tvorbě sraženin, byla využita ultrazvuková lázeň, aby se docílilo homogenního roztoku. Poté následovalo čištění roztoku vytřepáváním.

Nejdříve se z již získaných sumárních extraktů odstranily tuky pomocí vytřepání se 100 ml etheru, vytřepání se v dělicí nálevce o objemu 1000 ml provádí 3×. Po důkladném promíchání, následném ustálení tekutin a oddělení fází se kyselý předčištěný roztok (ve spodní vrstvě nálevky) alkalizuje 10 % uhličitanem sodným na pH 9–10. Následuje vytřepávání alkalického roztoku do organických rozpouštědel, které je možné díky přechodu alkaloidů na původní bazické látky. Druhé vytřepávání se provádí s ethylacetátem, opakuje se 4×. Ethylacetátové vrchní vrstvy se po každém vytřepávání spojí, následně se dají odpařovat na vakuovou odparku. Stejným způsobem se ještě 3× vytřepává s chloroformem, kdy chloroformová vrstva je v dolní části baňky. Chloroformové výtřepky se opět spojí a dají odpařit.

Z vytřepávání a následného odpaření vzešlo dohromady 8 vzorků, tedy ethylacetátový a chloroformový vzorek z každého ze čtyř zkoumaných druhů.

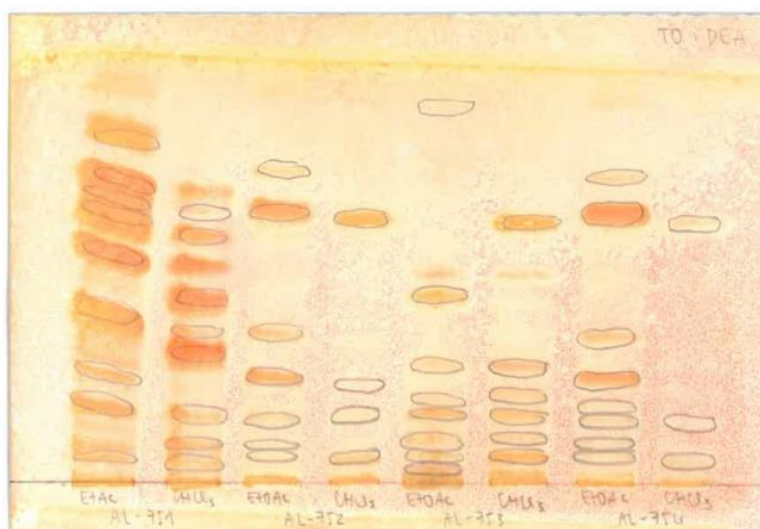
### 4.2.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Získané alkaloidní extrakty byly rozpuštěny v ethanolu a následně naneseny pomocí tenké kapiláry na TLC desku. TLC desky se následně vložila do předem nasycených vyvíjecích komor. Vyvíjecí směsi se nechaly v uzavřené komoře po dobu 15 minut, aby došlo k nasycení komory mobilní fází. Silikagelová destička, která představuje fázi stacionární, se vložila do komory a čekalo se na vyvinutí mobilní fáze. Vyvíjení se zastavilo při dosažení čela destičky a následně se deska vysušila v digestoři.

### 4.2.3 Detekce alkaloidů

Po vyvinutí TLC desky byla zkoumána pod UV lampou při vlnové délce 254 a 366 nm. Lampa detekovala zóny, které sejevily jako tmavé skvrny na zeleně fluoreskujícím poli. Šlo o alkaloidní látky, které pohltily UV světlo.

Detekce byla následně prováděna postřikem Dragendorffovým činidlem. V přítomnosti alkaloidních látek došlo k vytvoření oranžově zabarveného komplexu alkaloidu a činidla, který je viditelný pod viditelným spektrem.



Obrázek 20 – TLC po postřiku Dragendorffovým činidlem

### 4.2.4 GC-MS analýza alkaloidních extraktů

Po odpaření byly chloroformové a ethylacetátové extrakty přibližně po 2 mg odváženy do vialek společně s malým množstvím methanolu. Alkaloidní profil zkoumaných rostlin se měřil pomocí techniky GC-MS.

Jde o kombinaci dvou analytických postupů, GC slouží k oddělení složek sloučeniny a MS tyto složky analyzuje. Spojení obou metod pomáhá identifikovat složení vzorků, má vynikající separační účinnost, což vede k vysoké přesnosti a preciznosti výsledků. Technika GC-MS má značnou hodnotu pro dosažení korelace mezi bioaktivními sloučeninami a jejich aplikací ve farmakologii. [62]

Podmínky měření

- instrument: plynový chromatograf
- kolona: HP-5 MS (30 m×0,25 mm×0,25 μm)
- teplotní program: 100 °C–180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180 °C–300 °C (5 °C/min), 300 °C (5 min)
- mobilní fáze: helium
- průtok mobilní fáze: 0,8 ml/min
- nástřik: 1 μl, split 1:10, 280 °C
- detekce: hmotnostní spektrometr (ionizační energie 70 eV)
- rozsah měření hodnot: 40–600 m/z

Výsledné chromatogramy s peaky vyznačující obsažené alkaloidy byly porovnány s hmotnostními spektry v komerční knihovně spekter NIST 11. Spektra, která nebyla nalezena v komerční knihovně, se srovnala se spektry takových látek, jež byly na katedře farmakognozie v minulosti izolovány a byla jim vytvořena vlastní knihovna spekter. Pomocí srovnávacích hodnocení byly identifikovány alkaloidy obsažené ve zkoumaných extraktech.

### 4.3 Screening inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE

#### 4.3.1 Potřeby

##### 4.3.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

Tabulka 4 – Přehled rozpouštědel a chemikálií

Název	Vzorec/zkratka	Výrobce
Acetylthiocholin jodid p. a.	ATChI	Sigma Aldrich s.r.o.
Butyrylthiocholin jodid p. a.	BuTChI	Sigma Aldrich s.r.o.
Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Lach-Ner, Neratovice
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a.	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Ing. Švec – Penta, Praha
Dimethylsulfoxid p. a.	DMSO	Sigma Aldrich, Německo
5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$	DTNB	Sigma Aldrich, Praha
Eserin		Sigma Aldrich s.r.o.
Galanthamin hydrobromid 95%		Changsha Organic Herb Inc., China
Huperzin A 95%		TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China
Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a.	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Ing. Švec – Penta, Praha

##### 4.3.1.2 Činidla

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

##### 4.3.1.3 Tlumivé roztoky

- 100 mM fosfátový pufr (pH 7,4)



#### **4.3.1.4 Příkladové vybavení**

- Reader Synergy™ HT Multi. Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Třepačka VWR standard analog shaker 1000 (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)
- Program pro vyhodnocení statistických dat GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

#### **4.3.2 Rekombinantní enzymy**

Enzymy, které byly využity k určení biologické aktivity zkoumaných extraktů, byly připraveny pomocí rekombinantní technologie na chemické katedře Přírodovědné fakulty Univerzity Hradec Králové. Pro tyto účely se využívá médium s enzymy, jež se v čase potřeby naředí pomocí 100 mM fosfátového pufru s pH 7,4, aby se dosáhlo požadované hodnoty absorbance 0,08–0,15 pro AChE a 0,15–0,20 pro BuChE. Toto médium se pak dávkuje do Eppendorf zkumavek v množství potřebném pro další ředění a měření. Připravená média jsou následně zamražena a skladována v mrazicím boxu při teplotě -22 °C až do momentu, kdy jsou potřeba.

#### **4.3.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE**

K určení inhibiční aktivity vůči humánním ChE bylo 3–5 mg extraktů odváženo do Eppendorf zkumavek. Inhibiční aktivita byla měřena pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody. Při měření byl monitorován nárůst absorbance v průběhu jedné minuty.

##### **4.3.3.1 Stanovení inhibiční aktivity enzymů**

Pro měření aktivity enzymů bylo do šesti jamek mikrotitrační destičky přeneseno 8,3 µl média, 283 µl 5 mM DTNB a 8,3 µl DMSO. Směs byla promíchána třepačkou po dobu jedné minuty a následně inkubována v komoře readeru při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci bylo do směsi přidáno 33,3 µl substrátového roztoku, buď 10 mM ATChI nebo 10 mM BuTChI. Absorbance byla změřena při vlnové délce 412 nm. Následně byl vyhodnocen rozdíl absorbancí mezi začátkem a koncem měření a byla

vypočítána průměrná hodnota inhibice s uvedením směrodatné odchylky podle příslušného vzorce.

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

% I – procento inhibice

$\Delta ABL$  – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min

$\Delta ASA$  – absorbance testovaného vzorku během 1 min

#### **4.3.3.2 Stanovení inhibiční aktivity extraktů**

Pro zjištění inhibiční aktivity alkaloidních extraktů byla použita stejná měřicí metoda. Na mikrotitrační destičky byly napipetovány stejné objemy reagentů, avšak namísto 8,3  $\mu$ l DMSO byl použit roztok extraktu v odpovídající koncentraci. Pro každou látku bylo využito 6 jamek (jedna řada) a v poslední řadě byl jako slepý vzorek napipetován DMSO. Nejprve se provedl screening, při němž byly všechny látky testovány na koncentraci 50  $\mu$ g/ml. U těch extraktů, které při této počáteční koncentraci projevíly inhibiční účinek vyšší než 60 %, byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ .

#### **4.3.3.3 Stanovení hodnoty $IC_{50}$**

Hodnota  $IC_{50}$  byla určena pomocí řady 500 – 50 – 5 – 0,5 – 0,05  $\mu$ g/ml. K výpočtu  $IC_{50}$  se použila data z poklesu aktivity enzymů AChE nebo BuChE, která byla analyzována pomocí nelineární regrese v softwaru GraphPad Prism. Získané hodnoty  $IC_{50}$  pro jednotlivé extrakty byly následně porovnány s inhibičními účinky referenčních látek, jako jsou galanthamin, eserin a huperzin A.

## 5 Výsledky

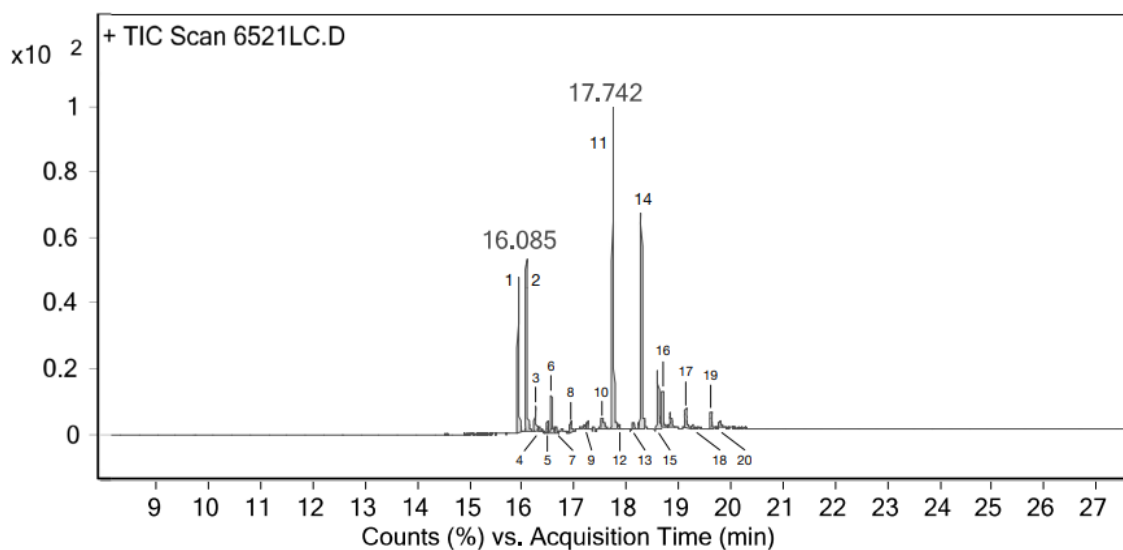
### 5.1 Zpracování výsledků screeningu

Tabulka 5 – Výsledné hmotnosti alkaloidních extraktů

Číslo vzorku	Taxon	Hmotnost cibulí	EtOH extrakt	Alkaloidní extrakt	
				EtOAc	CHCl <sub>3</sub>
AL-751	<i>Crinum erubescens</i>	220,9 g	12,7 g	0,3148 g	0,0618 g
AL-752	<i>Hippeastrum puniceum</i>	320,3 g	19,7 g	0,1185 g	0,0329 g
AL-753	<i>Hippeastrum striatum</i>	243,2 g	20,5 g	0,1944 g	0,0800 g
AL-754	<i>Hymenocallis occidentalis</i>	215,4 g	8,45 g	0,0705 g	0,0126 g

Jednotlivé extrakty byly dále analyzovány pomocí GC-MS, výsledné chromatogramy byly porovnány. V některých případech jsou zobrazeny výsledné chromatogramy pouze jednoho typu extraktu – ethylacetátového či chloroformového. Je to z toho důvodu, že na druhém chromatogramu téhož druhu rostliny byly alkaloidy stejné.

### 5.1.1 AL-751

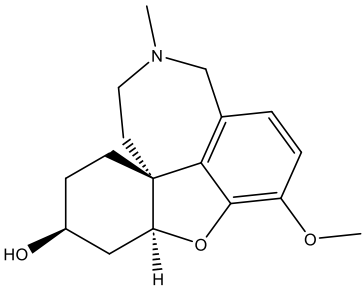
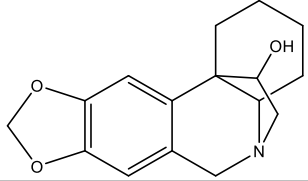
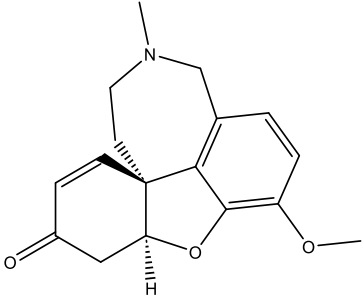
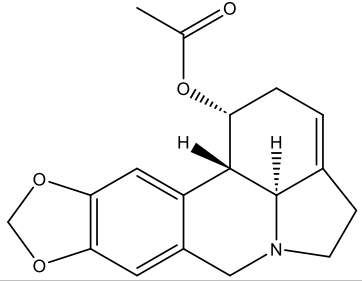
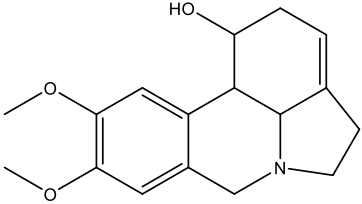


Obrázek 21 – Chromatogram ethylacetátového extraktu

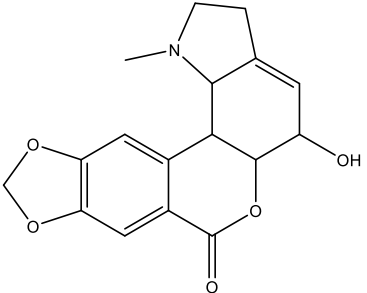
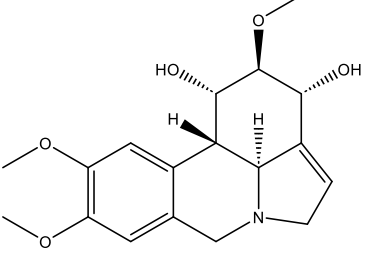
Tabulka 6 – Predikce alkaloidů obsažené v ethylacetátovém extraktu

V rámci hodnocení bylo pro danou látku vybráno více peaků, které svojí molekulovou hmotností a štěpením mohou dané látce nejlépe odpovídat a může se tak jednat o izomery. V případě neznámých látek je uveden otazník a pouze předpokládaná molekulová hmotnost daného peaku.

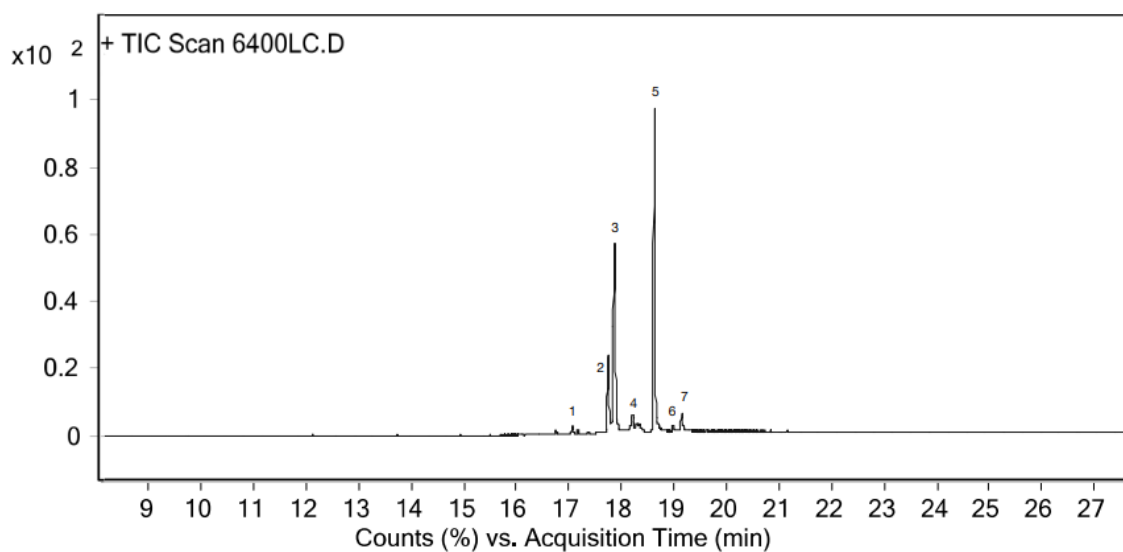
Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	?	287,3		
2	?	289,4		
3	Galanthamine	287,3	$C_{17}H_{21}NO_3$	

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
4	Lycoramine	289,4	$C_{17}H_{23}NO_3$	
5	Crinan-11-ol	273,3	$C_{16}H_{19}NO_3$	
6	Galanthaminon	285,3	$C_{17}H_{19}NO_3$	
7	?	227,3		
8	Galanthan-1-ol	313,3	$C_{18}H_{19}NO_4$	
9	Pluvine	287,3	$C_{17}H_{21}NO_3$	
10	?	227,3		
11	?	273,3		

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
12	Lycorenan	227,3	$C_{15}H_{17}NO$	
13	Panracine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
14	?	313,3		
15	Lycorine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
16	?	315,3		
17	1,2-dihydro-chlidanthine	289,4	$C_{17}H_{23}NO_3$	
18	1-O-acetyl-lycorine	329,3	$C_{18}H_{19}NO_5$	

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
19	Lycorenan-7-one	315,3	$C_{17}H_{17}NO_5$	 <p>The structure of Lycorenan-7-one is a complex polycyclic molecule. It features a central six-membered ring with a carbonyl group (=O) at the 7-position and a hydroxyl group (-OH) at the 10-position. This central ring is fused to a five-membered ring containing a nitrogen atom with a methyl group (-CH<sub>3</sub>) attached. Another five-membered ring is fused to the central ring, containing two oxygen atoms in a cyclic acetal-like arrangement. A benzene ring is also fused to the central ring, with two oxygen atoms attached at the 1 and 2 positions.</p>
20	Narcissidine	333,4	$C_{18}H_{23}NO_5$	 <p>The structure of Narcissidine is a complex polycyclic molecule. It features a central six-membered ring with a nitrogen atom at the 10-position. This ring is fused to a five-membered ring containing a nitrogen atom with a methyl group (-CH<sub>3</sub>) attached. Another five-membered ring is fused to the central ring, containing two oxygen atoms in a cyclic acetal-like arrangement. A benzene ring is also fused to the central ring, with two methoxy groups (-OCH<sub>3</sub>) attached at the 1 and 2 positions. The central ring has a hydroxyl group (-OH) at the 7-position and a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 10-position. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds for the hydroxyl groups and the hydrogen atoms at the 7 and 10 positions.</p>

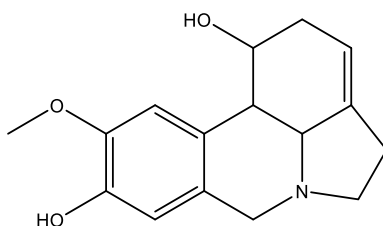
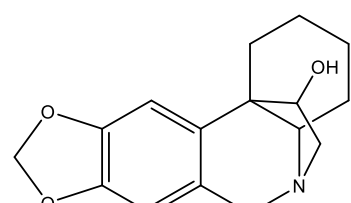
### 5.1.2 AL-752



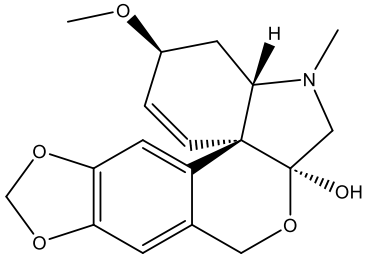
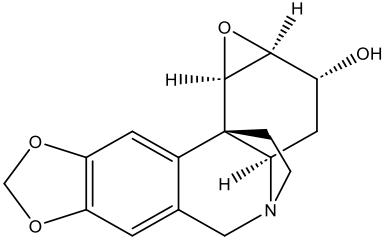
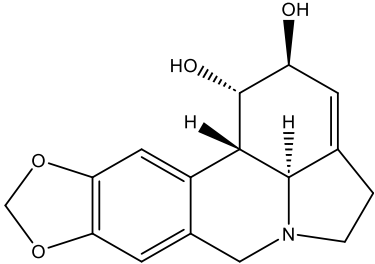
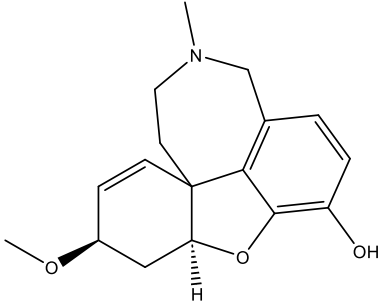
**Obrázek 22 – Chromatogram ethylacetátového extraktu**

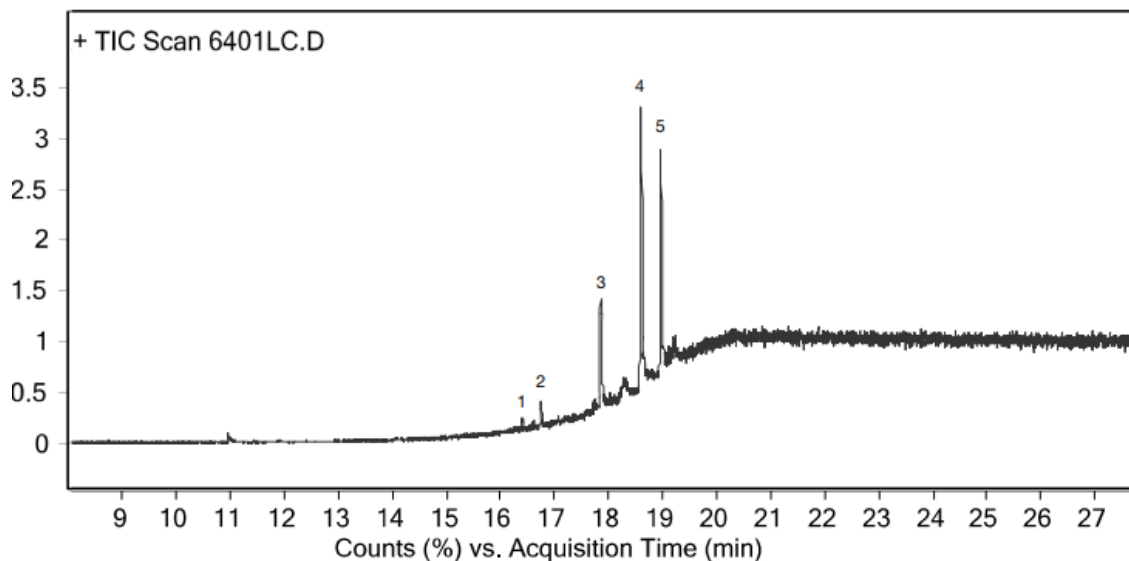
**Tabulka 7 – Predikce alkaloidů obsažené v ethylacetátovém extraktu**

V rámci hodnocení bylo pro danou látku vybráno více peaků, které svojí molekulovou hmotností a štěpením mohou dané látce nejlépe odpovídat a může se tak jednat o izomery. V případě neznámých látek je uveden otazník a pouze předpokládaná molekulová hmotnost daného peaku.

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	Norpluvine	273,3	$C_{16}H_{19}NO_3$	
2	Crinan-11-ol	273,3	$C_{16}H_{19}NO_3$	



Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
3	Tazettine	331,4	$C_{18}H_{21}NO_5$	
4	Flexinine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
5	Lycorine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
6	Chlidanthine	287,3	$C_{17}H_{21}NO_3$	
7	?	287,3		

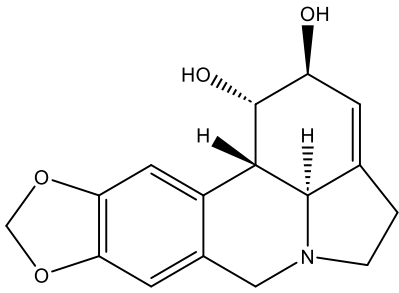


Obrázek 23 – Chromatogram chloroformového extraktu

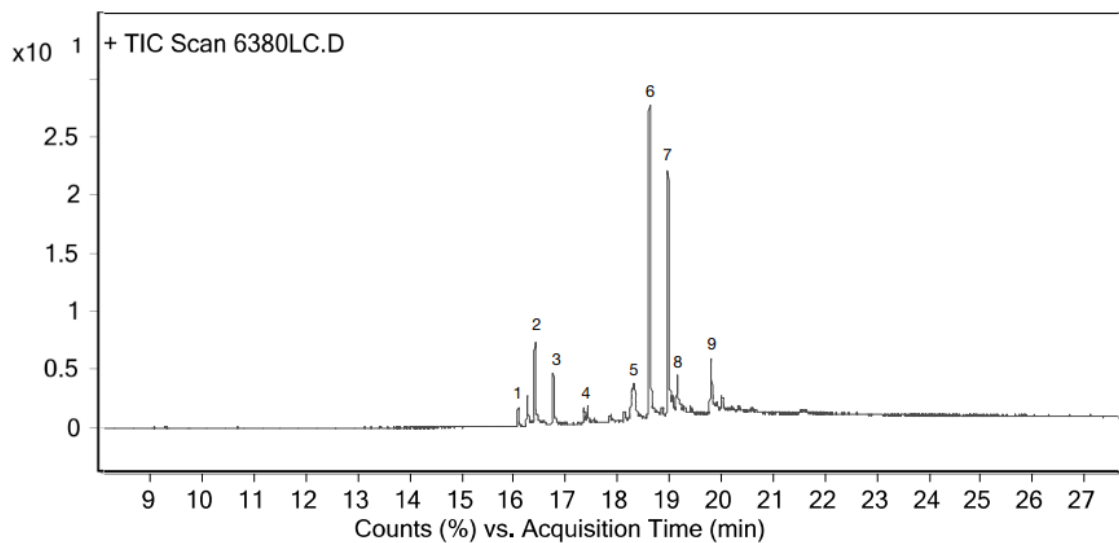
Tabulka 8 – Predikce alkaloidů obsažené v chloroformovém extraktu

V rámci hodnocení bylo pro danou látku vybráno více peaků, které svojí molekulovou hmotností a štěpením mohou dané látce nejlépe odpovídat a může se tak jednat o izomery. V případě neznámých látek je uveden otazník a pouze předpokládaná molekulová hmotnost daného peaku.

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	?	129,2		
2	Crinan-3 $\alpha$ -ol	271,3	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	
3	Tazettine	331,4	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
4	Lycorine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
5	?	347,1		

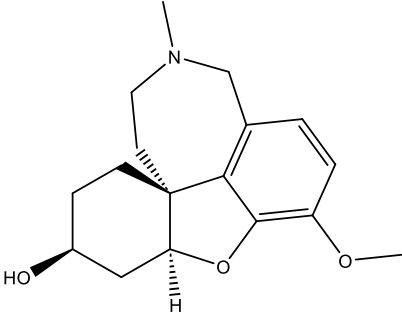
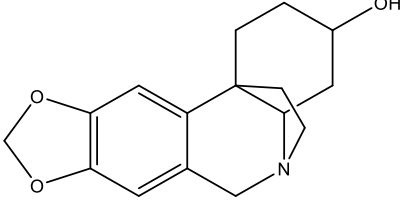
### 5.1.3 AL-753

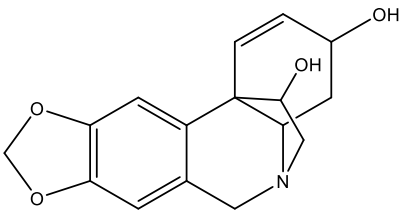
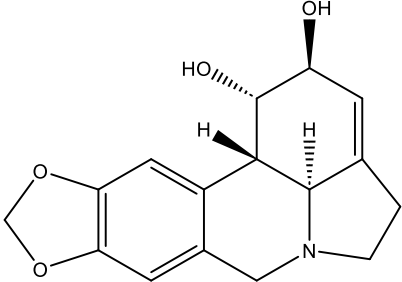
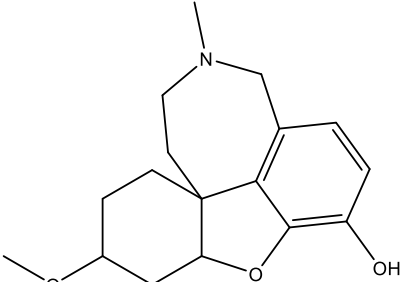
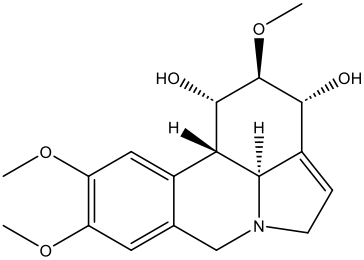


Obrázek 24 – Chromatogram chloroformového extraktu

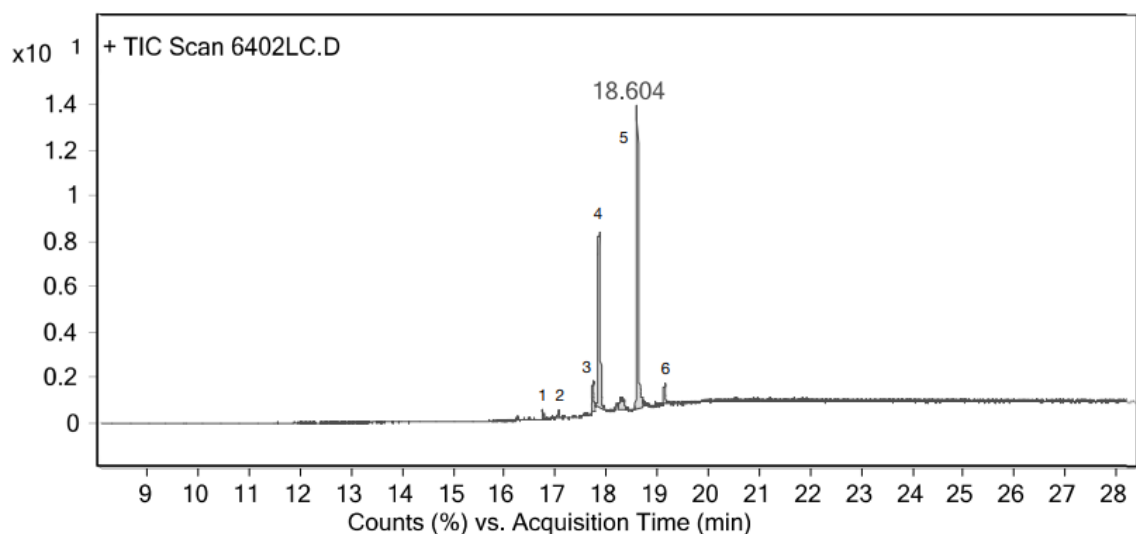
Tabulka 9 – Predikce alkaloidů obsažené v chloroformovém extraktu

V rámci hodnocení bylo pro danou látku vybráno více peaků, které svojí molekulovou hmotností a štěpením mohou dané látce nejlépe odpovídat a může se tak jednat o izomery. V případě neznámých látek je uveden otazník a pouze předpokládaná molekulová hmotnost daného peaku.

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	Lycoramine	289,4	$C_{17}H_{23}NO_3$	
2	?	neznámá		
3	Crinan-3 $\alpha$ -ol	271,3	$C_{16}H_{17}NO_3$	
4	?	287,3		

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
5	11-hydroxy-vittatine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
6	Lycorine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
7	?	347,1		
8	1,2-dihydro-chlidanthine	289,4	$C_{17}H_{23}NO_3$	
9	Narcissidine	333,4	$C_{18}H_{23}NO_5$	

### 5.1.4 AL-754

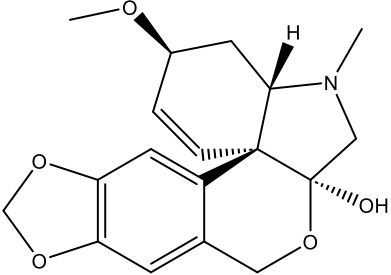
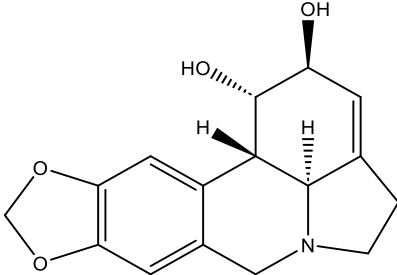
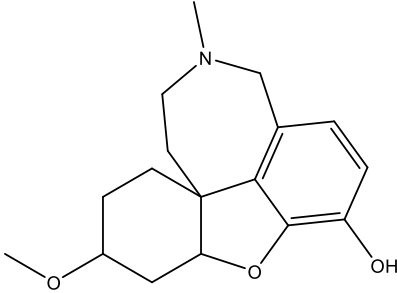


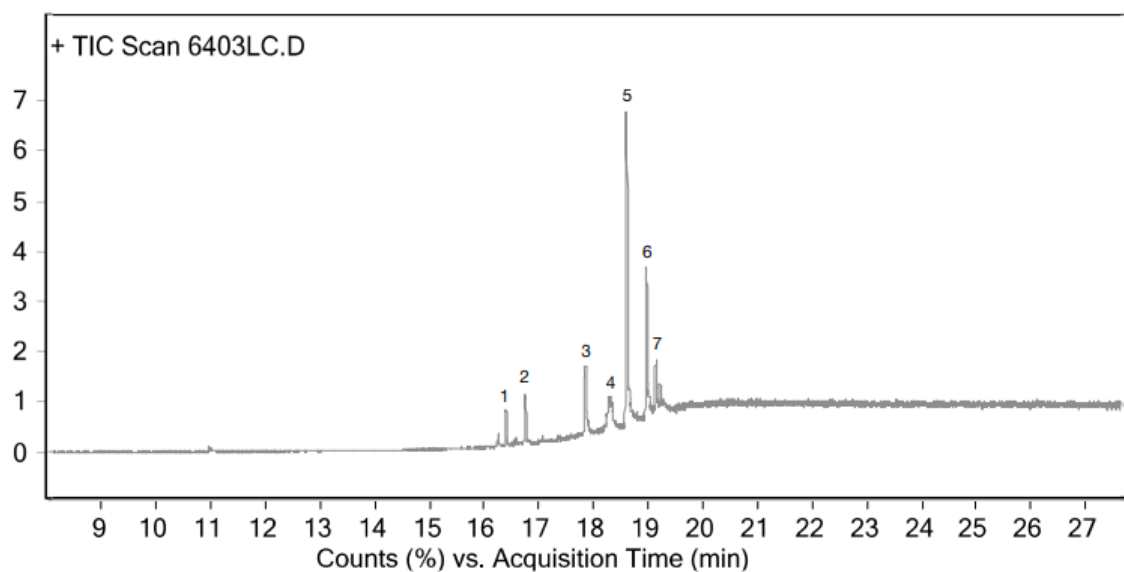
Obrázek 25 – Chromatogram ethylacetátového extraktu

Tabulka 10 – Predikce alkaloidů obsažené v ethylacetátovém extraktu

V rámci hodnocení bylo pro danou látku vybráno více peaků, které svojí molekulovou hmotností a štěpením mohou dané látce nejlépe odpovídat a může se tak jednat o izomery. V případě neznámých látek je uveden otazník a pouze předpokládaná molekulová hmotnost daného peaku.

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	Crinan-3 $\alpha$ -ol	271,3	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	
2	Norpluvine	273,3	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	
Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec

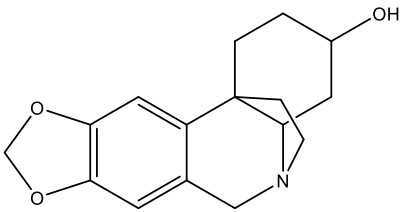
3	?	272,1		
4	Tazettine	331,4	$C_{18}H_{21}NO_5$	 The structure of Tazettine is a complex polycyclic alkaloid. It features a central benzene ring fused to a five-membered ring containing an oxygen atom. This is further fused to a six-membered ring with a nitrogen atom. A side chain includes a double bond, a methoxy group (-OCH3), and a methyl group (-CH3). A hydroxyl group (-OH) is attached to the nitrogen-containing ring.
5	Lycorine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	 The structure of Lycorine is a complex polycyclic alkaloid. It consists of a benzene ring fused to a five-membered ring with an oxygen atom, which is further fused to a six-membered ring containing a nitrogen atom. The structure is highly substituted with multiple hydroxyl groups (-OH) and a double bond.
6	1,2-dihydro-chlidanthine	289,4	$C_{17}H_{23}NO_3$	 The structure of 1,2-dihydro-chlidanthine is a complex polycyclic alkaloid. It features a benzene ring fused to a five-membered ring with an oxygen atom, which is further fused to a six-membered ring containing a nitrogen atom. The structure is substituted with a methoxy group (-OCH3) and a hydroxyl group (-OH).



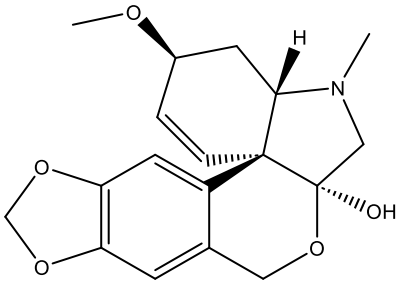
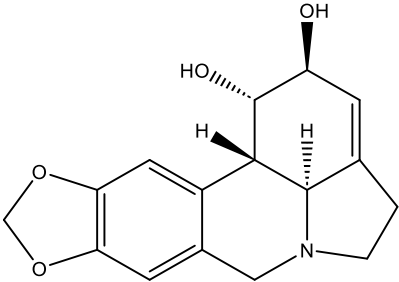
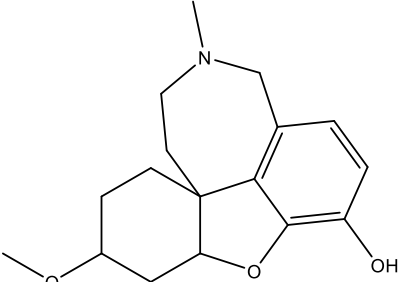
**Obrázek 26 – Chromatogram chloroformového extraktu**

**Tabulka 11 – Predikce alkaloidů obsažené v chloroformovém extraktu**

V rámci hodnocení bylo pro danou látku vybráno více peaků, které svojí molekulovou hmotností a štěpením mohou dané látce nejlépe odpovídat a může se tak jednat o izomery. V případě neznámých látek je uveden otazník a pouze předpokládaná molekulová hmotnost daného peaku.

Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	?	281,0		
2	Crinan-3 $\alpha$ -ol	271,3	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	



Číslo peaku	Název	Molekulární hmotnost	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
3	Tazettine	331,4	$C_{18}H_{21}NO_5$	
4	?	341,0		
5	Lycorine	287,3	$C_{16}H_{17}NO_4$	
6	?	347,1		
7	1,2-dihydro-chlidanthine	289,4	$C_{17}H_{23}NO_3$	

**Tabulka 12 – Porovnání jednotlivých alkaloidů obsažených v ethylacetátových a chloroformových extraktech**

<b>Alkaloid</b>	<b>AL-751 EtOAc</b>	<b>AL-752 EtOAc</b>	<b>AL-752 CHCl<sub>3</sub></b>	<b>AL-753 CHCl<sub>3</sub></b>	<b>AL-754 EtOAc</b>	<b>AL-754 CHCl<sub>3</sub></b>
1- <i>O</i> -acetyl-lycorine	✓					
Crinan-11-ol	✓	✓				
Crinan-3 $\alpha$ -ol			✓	✓	✓	✓
1,2-dihydro-chlidanthine	✓			✓	✓	✓
Flexinine		✓				
Galanthamine	✓					
Galanthaminone	✓					
Galanthan-1-ol	✓					
11-hydroxy-vittatine				✓		
Chlidanthine		✓				
Lycoramine	✓			✓		
Lycorenan	✓					
Lycorenan-7-one	✓					
Lycorine	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Narcissidine	✓					
Norpluvine		✓			✓	
Panracine	✓					
Pluvine	✓					
Tazettine		✓	✓		✓	✓

## 5.2 Výsledky inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE

Tabulka 13 – Výsledky stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám

Číslo vzorku	Typ alkaloidního extraktu	% inhibice AChE (50 µg/ml)	IC <sub>50</sub> AChE (µg/ml)	% inhibice BuChE (50 µg/ml)	IC <sub>50</sub> BuChE (µg/ml)
AL-751	EtOAc	<b>87,73 ± 0,80</b>	<b>69,60 ± 5,81</b>	<b>78,58 ± 3,66</b>	<b>86,27 ± 1,17</b>
	CHCl <sub>3</sub>	0	-	0	-
AL-752	EtOAc	19,88 ± 4,11	-	43,36 ± 2,02	-
	CHCl <sub>3</sub>	22,38 ± 2,39	-	14,26 ± 2,59	-
AL-753	EtOAc	50,53 ± 2,63	-	17,54 ± 2,76	-
	CHCl <sub>3</sub>	<b>59,09 ± 1,52</b>	<b>66,10 ± 2,87</b>	13,19 ± 1,00	-
AL-754	EtOAc	23,88 ± 4,63	-	39,13 ± 2,95	-
	CHCl <sub>3</sub>	41,00 ± 3,67	-	35,58 ± 2,17	-
<b>Standardy</b>					
	Eserin	-	0,20 ± 0,01	-	0,30 ± 0,01
	Huperzin A	-	0,04 ± 0,01	-	-
	Gаланthamin	94,41 ± 0,49	2,01 ± 0,14	-	33,69 ± 2,66

Tabulka ukazuje výsledky měření inhibiční aktivity extraktů vůči lidským cholinesterasám. Pouze u extraktů, jejichž inhibiční aktivita přesáhla 60 %, byla stanovena hodnota IC<sub>50</sub>. Jednotlivé alkaloidní látky byly porovnány se standardy.

## 6 Diskuse a závěr

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou kvůli svým účinkům na organismus podrobně zkoumány zaslouženě. Ať se jedná o zástupce známé již dlouho (rod *Narcissus*, *Galanthus*, *Leucojum*), či o rody a druhy objevené nedávno, všechny mají v sobě potenciálně vhodné sloučeniny pro léčebné účely. Nejintenzivněji vyšetřovanou oblastí účinků amaryllidových je jejich schopnost působit proti lidským cholinesterasám. Cílem inhibice cholinesteras, především AChE, je zpomalení symptomů Alzheimerovy choroby. Snaha o pozastavení upadávajících kognitivních funkcí a intelektuálních schopností je jediným krokem, jímž se dá proti AD bojovat, kompletně se zatím totiž vyléčit nedá.

Účelem této práce bylo získat alkaloidní extrakty (chloroformové a ethylacetátové) doposud málo fytochemicky zpracovaných vybraných druhů čeledi Amaryllidaceae, pomocí GC-MS analýzy stanovit obsah alkaloidů a následně změřit jejich inhibiční aktivitu vůči humánním cholinesterasám. Zkoumány byly druhy *Crinum erubescens* (AL-751), *Hippeastrum puniceum* (AL-752), *Hippeastrum striatum* (AL-753) a *Hymenocallis occidentalis* (AL-754). Analýza ukázala přítomnost 20 alkaloidů, nejčastěji typu lykorinového (všechny vzorky obsahovaly lykorin), galanthaminového a krinanového. Často zastoupeným AA byl dále crinan-3 $\alpha$ -ol, který se nacházel ve všech extraktech kromě AL-751 (EtOAc) a AL-752 (EtOAc). Třetím nejvýznamnějším nálezem byla přítomnost tazettinu, jenž nefiguroval pouze v AL-751 (EtOAc) a AL-753 (CHCl<sub>3</sub>). Menší zastoupení měly alkaloidy crinan-11-ol, lycoramine, norpluvine a další (viz Tabulka 11). Porovnáním retenčních časů alkaloidů, které se vyskytovaly ve více extraktech, se získala přesnější představa o správnosti predikce obsažených alkaloidů. Nejvíce AA (13) se podařilo identifikovat v EtOAc vzorku AL-751 a analýza obecně ukázala, že kvalitativně i kvantitativně bohatší byly ethylacetátové alkaloidní extrakty. Bylo nalezeno 17 neznámých látek, u kterých byla uvedena předpokládaná molekulová hmotnost. Jedna alkaloidní látka, konkrétně na pozici 2 na chromatogramu AL-753 (CHCl<sub>3</sub>), se vůbec nedokázala určit.

Při stanovení inhibiční aktivity extraktů vůči AChE vykazovaly větší procento inhibice spíše extrakty chloroformové, zejména ze vzorku AL-753 (viz Tabulka 12). Výjimkou byl extrakt ethylacetátový AL-751, který měl nejvyšší inhibiční potenciál ze všech.

Byly to ale pouze tyto 2 vzorky, u nichž inhibiční aktivita přesáhla 60 %, a mohla tak být stanovena hodnota IC<sub>50</sub>. Jedinou aktivitu proti BuChE ukázal opět EtOAc extrakt AL-751, díky jeho vysokému procentuálnímu výsledku se mohlo pokračovat s měřením IC<sub>50</sub>. Dominantní postavení AL-751 může být spojené s obsahem AA galanthaminového typu – galanthaminem, galanthaminonem a galanthan-1-olem. Název druhu pod kódem AL-751 je *Crinum erubescens*. Výsledky měření odpovídají svojí aktivitou obsahu galanthaminu, sám galanthamin je užíván v terapii AD, kvůli své schopnosti inhibovat AChE.

K dalšímu fytochemickému zpracování by byl vhodný druh *Crinum erubescens* (AL-751), ve kterém je největší množství neznámých alkaloidních látek.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] GETTER, Kristin. Benefits of plants: Life as we know it, live it and pay for it. *Michigan State University* [online]. červenec 2015. Dostupné z: [https://www.canr.msu.edu/news/benefits\\_of\\_plants\\_life\\_as\\_we\\_know\\_it\\_live\\_it\\_and\\_pay\\_for\\_it](https://www.canr.msu.edu/news/benefits_of_plants_life_as_we_know_it_live_it_and_pay_for_it)
- [2] Plants and Climate Change. *National Park Service* [online]. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.nps.gov/articles/000/plants-climateimpact.htm>
- [3] JAMSHIDI-KIA, Fatemeh, Zahra LORIGOOINI a Hossein AMINI-KHOEI. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmед Pharmacology* [online]. 2018, **7**(1), 1–7 [vid. 2024-04-09]. ISSN 2345-5004. Dostupné z: doi:10.15171/jhp.2018.01
- [4] HUSSAIN, Md. Sarfaraj, Md. Akhlaquer RAHMAN, Sheeba FAREED, Saba ANSARI, IffatZareen AHMAD, a MOHD. SAEED. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 2012, **4**(1), 10 [vid. 2024-04-09]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.92725
- [5] GUERRIERO, Gea, Roberto BERNI, J. MUÑOZ-SANCHEZ, Fabio APONE, Eslam ABDEL-SALAM, Ahmad QAHTAN, Abdulrahman ALATAR, Claudio CANTINI, Giampiero CAI, Jean-Francois HAUSMAN, Khawar SIDDIQUI, S. HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR a Mohammad FAISAL. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes* [online]. 2018, **9**(6), 309 [vid. 2024-04-09]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes9060309
- [6] WFO (2024). Amaryllidaceae J.St.-Hil. Published on the Internet. *World Flora Online* [online]. květen 2024. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000018>
- [7] DING, Yan, Dan QU, Kai-Mei ZHANG, Xiao-Xin CANG, Zi-Nong KOU, Wei XIAO a Jing-Bo ZHU. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* [online]. 2017, **19**(1), 53–100 [vid. 2023-12-17]. ISSN 1028-6020, 1477-2213. Dostupné z: doi:10.1080/10286020.2016.1198332
- [8] GRULICH, Vít. Amaryllidaceae J. St.-Hil. – amarylkovité. *botany.cz* [online]. jaro 2020. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/>
- [9] ABOU-DONIA, Amina H., Soad M. TOAIMA, Hala M. HAMMODA, Eman SHAWKY, Eri KINOSHITA a Hiromitsu TAKAYAMA. Phytochemical and Biological Investigation of *Hymenocallis littoralis* SALISB. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2008, **5**(2), 332–340 [vid. 2024-01-13]. ISSN 1612-1872, 1612-1880. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.200890031

- [10] HE, Maomao, Chunrong QU, Oude GAO, Xianming HU a Xuechuan HONG. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(21), 16562–16574 [vid. 2023-12-15]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA14666B
- [11] GRULICH, Vít. *Crinum erubescens* L. f. ex Aiton – křín. *botany.cz* [online]. jaro 2014. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/crinum-erubescens/>
- [12] MIKŠÁTKOVÁ, Petra, Petra LANKOVÁ, Lukáš HUML a Oldřich LAPČÍK. Isoflavonoids in the Amaryllidaceae family. *Natural Product Research* [online]. 2014, **28**(10), 690–697 [vid. 2023-12-17]. ISSN 1478-6419, 1478-6427. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2013.873432
- [13] JIN, Zhong. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports* [online]. 2007, **24**(4), 886 [vid. 2023-12-17]. ISSN 0265-0568, 1460-4752. Dostupné z: doi:10.1039/b502163b
- [14] NAIR, Jerald J. a Johannes VAN STADEN. Pharmacological studies of *Crinum*, *Ammocharis*, *Amaryllis* and *Cyrtanthus* species of the South African Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany* [online]. 2022, **147**, 238–244 [vid. 2023-12-15]. ISSN 02546299. Dostupné z: doi:10.1016/j.sajb.2021.12.021
- [15] STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. *Angiosperm Phylogeny Website, version 14* [online]. červen 2017. Dostupné z: <https://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>
- [16] CAHLÍKOVÁ, Lucie. Biogeneze přírodních látek: Alkaloidy. In: *Kurz přednášek: Farmakognozie I – Sekundární metabolismy rostlin: Alkaloidy*. Katedra farmaceutické botaniky, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové. podzim 2023.
- [17] LUCHETTI, Giovanni, Robert JOHNSTON, Véronique MATHIEU, Florence LEFRANC, Kathryn HAYDEN, Anna ANDOLFI, Delphine LAMORAL-THEYS, Mary R. REISENAUER, Cody CHAMPION, Stephen C. PELLY, Willem A. L. VAN OTTERLO, Igor V. MAGEDOV, Robert KISS, Antonio EVIDENTE, Snezna ROGELJ a Alexander KORNIENKO. Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. *ChemMedChem* [online]. 2012, **7**(5), 815–822 [vid. 2023-12-17]. ISSN 1860-7179, 1860-7187. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.201100608
- [18] YAPIJAKIS, Christos. Hippocrates of Kos, the father of clinical medicine, and Asclepiades of Bithynia, the father of molecular medicine. Review. *In Vivo (Athens, Greece)*. 2009, **23**(4), 507–514. ISSN 0258-851X.
- [19] DE ANDRADE, Jean Paulo, Natalia Belén PIGNI a Laura TORRAS-CLAVERIA. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Revista latinoamericana de química* [online]. 2012, **40**(2), 83–98. ISSN 0370-5943.

Dostupné z: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-59432012000200004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000200004)

- [20] KHALIFA, Marwa, Eman ATTIA, John FAHIM a Mohamed KAMEL. An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, **1**(2), 41–49 [vid. 2023-12-30]. ISSN 2535-2040. Dostupné z: doi:10.21608/jabps.2018.4088.1016
- [21] DALECKÁ, Markéta, Radim HAVELEK, Karel KRÁLOVEC, Lenka BRŮČKOVÁ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* [online]. 2013, **107**(9), 701–708. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/614>
- [22] LI, Aiqian, Zhifeng DU, Mei LIAO, Yulin FENG, Hanli RUAN a Hongliang JIANG. Discovery and characterisation of lycorine-type alkaloids in *Lycoris* spp. (Amaryllidaceae) using UHPLC-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis* [online]. 2019, **30**(3), 268–277 [vid. 2024-01-02]. ISSN 0958-0344, 1099-1565. Dostupné z: doi:10.1002/pca.2811
- [23] BERKOV, Strahil, Rumen DENEV, Borjana SIDJIMOVA, Yancho ZAREV, Alexandar SHKONDROV, Laura TORRAS-CLAVERIA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Gas chromatography–mass spectrometry of some homolycorine-type Amaryllidaceae alkaloids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2023, **37**(12), e9506 [vid. 2024-01-02]. ISSN 0951-4198, 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.9506
- [24] CAHLÍKOVÁ, Lucie, Ippei KAWANO, Martina ŘEZÁČOVÁ, Gerald BLUNDEN, Daniela HULCOVÁ a Radim HAVELEK. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews* [online]. 2021, **20**(1), 303–323 [vid. 2024-01-02]. ISSN 1568-7767, 1572-980X. Dostupné z: doi:10.1007/s11101-020-09675-8
- [25] BRU, Claire a Catherine GUILLOU. Total syntheses of crinine and related alkaloids. *Tetrahedron* [online]. 2006, **62**(38), 9043–9048 [vid. 2024-01-03]. ISSN 00404020. Dostupné z: doi:10.1016/j.tet.2006.07.005
- [26] SMETANOVÁ, Libuše, Pavel RYŠKA a Martin VALIŠ. Glioblastoma grade IV – long-term survival. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2020, **83/116**(3), 332–334 [vid. 2024-01-04]. ISSN 12107859, 18024041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2020332
- [27] NAIR, Jerald J. a Johannes VAN STADEN. Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany* [online]. 2021, **136**, 147–156 [vid. 2024-01-06]. ISSN 02546299. Dostupné z: doi:10.1016/j.sajb.2020.07.002



- [28] KOUTOVÁ, Darja, Negar MAAFI, Radim HAVELEK, Lubomír OPLETAL, Gerald BLUNDEN, Martina ŘEZÁČOVÁ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. *Molecules* [online]. 2020, **25**(10), 2337 [vid. 2024-01-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25102337
- [29] MAAFI, Negar. *Amaryllidaceae Alkaloids of Montanine type and Their Derivatives as Potential Drugs* [online]. Faculty of pharmacy in Hradec Králové, 2023. Doctoral Dissertation. Charles University. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/180263/140108790.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [30] FÜRST, Robert. Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica* [online]. 2016, **82**(16), 1389–1394 [vid. 2024-01-06]. ISSN 0032-0943, 1439-0221. Dostupné z: doi:10.1055/s-0042-115034
- [31] SIATKA, Tomáš. Nervový systém. In: *Kurz přednášek: Farmakognozie II*. Katedra farmakognozie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové, podzim 2023.
- [32] MARCO, Luis a Maria CARREIRAS. Galanthamine, a Natural Product for the Treatment of Alzheimers Disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* [online]. 2006, **1**(1), 105–111 [vid. 2024-01-07]. ISSN 15748898. Dostupné z: doi:10.2174/157488906775245246
- [33] KNÁPKOVÁ, Soňa. *Amaryllidaceae alkaloidy jako předlohy pro vývoj nových potenciálních léčiv* [online]. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/148021/120401796.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [34] AL MAMUN, Abdullah, Jana MAŘÍKOVÁ, Daniela HULCOVÁ, Jiří JANOUŠEK, Marcela ŠAFRATOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Tomáš KUČERA, Martina HRABINOVÁ, Jiří KUNEŠ, Jan KORÁBEČNÝ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(5), 800 [vid. 2024-01-07]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10050800
- [35] HOUGHTON, Peter J., Joseph M. AGBEDAHUNSI a Aderonke ADEGBULUGBE. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry* [online]. 2004, **65**(21), 2893–2896 [vid. 2024-01-08]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2004.08.052
- [36] GUERRIERI, Caroline Gastaldi, Natalia Belén PIGNI, Jean Paulo DE ANDRADE, Vanessa Dias DOS SANTOS, Franklin BINNS, Warley DE SOUZA BORGES, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Alkaloids from *Crinum erubescens* Aiton. *Arabian*

- Journal of Chemistry* [online]. 2016, **9**(5), 688–693 [vid. 2024-01-08]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2015.07.009
- [37] PRESLEY, Christopher C., Priscilla KRAI, Seema DALAL, Qingxi SU, Maria CASSERA, Michael GOETZ a David G.I. KINGSTON. New potently bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **24**(21), 5418–5422 [vid. 2024-01-08]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2016.08.058
- [38] ZYSKOWSKI, Kristof. *Crinum erubescens*. *iNaturalist* [online]. březen 2023. Dostupné z: <https://www.inaturalist.org/observations/150215345>
- [39] PŘÍSPĚVOVATELÉ BIOLIBU. Profil taxonu. *biolib.cz* [online]. 2024 1999. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id213127/>
- [40] ZIFFER-BERGER, Jotham a Agostinho CHICAIA. *Hippeastrum puniceum* (Amaryllidaceae), a new naturalized species in the flora of Angola. *Polish Botanical Journal* [online]. 2015, **60**(1), 111–112 [vid. 2024-01-08]. ISSN 2084-4352. Dostupné z: doi:10.1515/pbj-2015-0009
- [41] TALLINI, Luciana R., Raquel B. GIORDANI, Jean Paulo DE ANDRADE, Jaume BASTIDA a José Angelo S. ZUANAZZI. Structural Diversity and Biological Potential of Alkaloids from the Genus *Hippeastrum*, Amaryllidaceae: an Update. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2021, **31**(5), 648–657 [vid. 2024-01-12]. ISSN 1981-528X. Dostupné z: doi:10.1007/s43450-021-00211-z
- [42] CORTES, Natalie, Rafael Andrés POSADA-DUQUE, Rafael ALVAREZ, Fernando ALZATE, Strahil BERKOV, Gloria Patricia CARDONA-GÓMEZ a Edison OSORIO. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences* [online]. 2015, **122**, 42–50 [vid. 2024-01-09]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2014.12.011
- [43] VENGOLIS. *Hippeastrum puniceum* 00338. *Wikimedia commons* [online]. duben 2015. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hippeastrum\\_puniceum\\_00338.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hippeastrum_puniceum_00338.jpg)
- [44] SVOBODOVÁ, Věra. *Hippeastrum striatum* (Lam.) H. E. Moore – hvězdník. *botany.cz* [online]. zima 2013. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/hippeastrum-striatum/>
- [45] FOREST a Kim STARR. *Hippeastrum striatum*. *Wikimedia commons* [online]. březen 2008. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr\\_080327-3846\\_Hippeastrum\\_striatum.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr_080327-3846_Hippeastrum_striatum.jpg)
- [46] TAPIA-CAMPOS, Ernesto, Jose Manuel RODRIGUEZ-DOMINGUEZ, María de los Milagros REVUELTA-ARREOLA, Jaap M. VAN TUYL a Rodrigo BARBA-GONZALEZ. Mexican Geophytes II. Genera *Hymenocallis*, *Sprekelia* and *Zephyranthes*. *Global Science Books* [online]. 2012, **6**(1), 129–139. Dostupné

z: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2012/FOB\\_6\(SI1\)/FOB\\_6\(SI1\)129-139o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2012/FOB_6(SI1)/FOB_6(SI1)129-139o.pdf)

- [47] GARLAND, Mark A., Gerald L. SMITH a Patti J. ANDERSON. The Spider Lilies (Hymenocallis) Native to Florida. *Botany Circular* [online]. 2013, (39), 1–5. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Mark-Garland/publication/358930978\\_The\\_Spider\\_Lilies\\_Hymenocallis\\_Native\\_to\\_Florida/links/621e3959395296023159a110/The-Spider-Lilies-Hymenocallis-Native-to-Florida.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mark-Garland/publication/358930978_The_Spider_Lilies_Hymenocallis_Native_to_Florida/links/621e3959395296023159a110/The-Spider-Lilies-Hymenocallis-Native-to-Florida.pdf)
- [48] ŚWIT, Paweł, Aleksandra POLLAP a Joanna ORZEŁ. Spectroscopic Determination of Acetylcholine (ACh): A Representative Review. *Topics in Current Chemistry* [online]. 2023, **381**(4), 16 [vid. 2024-01-14]. ISSN 2365-0869, 2364-8961. Dostupné z: doi:10.1007/s41061-023-00426-9
- [49] COLOVIC, Mirjana B., Danijela Z. KRSTIC, Tamara D. LAZAREVIC-PASTI, Aleksandra M. BONDZIC a Vesna M. VASIC. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315–335 [vid. 2024-01-14]. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006
- [50] KLINKENBERG, Inge, Anke SAMBETH a Arjan BLOKLAND. Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research* [online]. 2011, **221**(2), 430–442 [vid. 2024-01-25]. ISSN 01664328. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbr.2010.11.033
- [51] ROY, Claudie, Gérard GROLLEAU, Serge CHAMOULAUD a Jean-Louis RIVIÈRE. PLASMA B-ESTERASE ACTIVITIES IN EUROPEAN RAPTORS. *Journal of Wildlife Diseases* [online]. 2005, **41**(1), 184–208 [vid. 2024-01-25]. ISSN 0090-3558. Dostupné z: doi:10.7589/0090-3558-41.1.184
- [52] NICOLET, Yvain, Oksana LOCKRIDGE, Patrick MASSON, Juan C. FONTECILLA-CAMPS a Florian NACHON. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(42), 41141–41147 [vid. 2024-01-26]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M210241200
- [53] TRANG, Amy a Paras B. KHADHAR. Physiology, Acetylcholinesterase. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.* [online]. leden 2024. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539735/>
- [54] JOHNSON, Glynis a Samuel W. MOORE. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochemistry International* [online]. 2012, **61**(5), 783–797 [vid. 2024-01-27]. ISSN 01970186. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2012.06.016
- [55] LOCKRIDGE, Oksana. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses.

- Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2015, **148**, 34–46 [vid. 2024-01-27]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
- [56] JANSSEN, Bernd a Bernd SCHÄFER. Galantamine. *ChemTexts* [online]. 2017, **3**(2), 7 [vid. 2024-01-31]. ISSN 2199-3793. Dostupné z: doi:10.1007/s40828-017-0043-y
- [57] RINNER, Uwe, Christian DANK a Tomas HUDLICKY. GALANTHAMINE. *Targets in Heterocyclic Systems. Vol. 20* [online]. 2016, (20), 283 [vid. 2024-01-31]. ISSN 1724-9449. Dostupné z: doi:10.17374/targets.2017.20.283
- [58] SORIA LOPEZ, Jose A., Hector M. GONZÁLEZ a Gabriel C. LÉGER. Alzheimer's disease. In: *Handbook of Clinical Neurology* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2024-02-22], s. 231–255. ISBN 978-0-12-804766-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3
- [59] SCHELTENS, Philip, Bart DE STROOPER, Miiia KIVIPELTO, Henne HOLSTEGE, Gael CHÉTELAT, Charlotte E TEUNISSEN, Jeffrey CUMMINGS a Wiesje M VAN DER FLIER. Alzheimer's disease. *The Lancet* [online]. 2021, **397**(10284), 1577–1590 [vid. 2024-02-22]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)32205-4
- [60] Alzheimer's Disease Genetics Fact Sheet. *National Institute of Aging* [online]. březem 2023. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/genetics-and-family-history/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>
- [61] VAN DER LEE, Sven J, Frank J WOLTERS, M Kamran IKRAM, Albert HOFMAN, M Arfan IKRAM, Najaf AMIN a Cornelia M VAN DUIJN. The effect of APOE and other common genetic variants on the onset of Alzheimer's disease and dementia: a community-based cohort study. *The Lancet Neurology* [online]. 2018, **17**(5), 434–444 [vid. 2024-02-23]. ISSN 14744422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(18)30053-X
- [62] THAMER, Faten Hameed a Noah THAMER. Gas chromatography – Mass spectrometry (GC-MS) profiling reveals newly described bioactive compounds in *Citrullus colocynthis* (L.) seeds oil extracts. *Heliyon* [online]. 2023, **9**(6), e16861 [vid. 2024-02-09]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2023.e16861

## Abstrakt

Němečková, K.: Screening biologické aktivity různých druhů rostlin z čeledi Amaryllidaceae.

Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2023, 70 s.

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

Čeď Amaryllidaceae je v přírodní říši nezastupitelná. V lidovém léčení slouží k řešení jednodušších onemocnění, jako je nachlazení či infekce. Rostlinné druhy této čeledi jsou v přírodě hojně rozšířené, jádro účinku tvoří sekundární metabolity. Stěžejními metabolity jsou amaryllkovité alkaloidy, které je možné kategorizovat do skupin podle základní struktury skeletu. Většina alkaloidů čeledi Amaryllidaceae má podobné působení, a jsou proto intenzivně zkoumány. Nejslibnější zástupci mají efekt protinádorový, antibakteriální, antimykotický, antivirový a antimalarický. Analyzovány jsou také schopnosti alkaloidů inhibovat humánní cholinesterasy, jež mohou mít neuroprotektivní účinky zejména na zhoršující se kognitivní funkce. Právě posuzování biologické aktivity a odhalování přítomnosti nových alkaloidů ve vybraných rostlinách bylo cílem této diplomové práce.

Vyšetřovány byly druhy *Crinum erubescens*, *Hippeastrum puniceum*, *Hippeastrum striatum* a *Hymenocallis occidentalis*. Z jejich cibulí byly vytvořeny sumární ethanolové extrakty, ze kterých se následným vytřepáváním chloroformem a ethylacetátem získaly extrakty alkaloidní. Takto získané extrakty byly podrobeny GC-MS analýze, díky níž se identifikovaly některé z obsažených alkaloidů. Jednotlivé alkaloidní extrakty byly dále testovány pro svou inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase, která může být zásadní při vývoji léčby Alzheimerovy choroby. Alkaloidní extrakty s obsahem galanthaminu byly vůči acetylcholinesterase významně aktivnější. Z fytochemického hlediska bylo nejvíce neznámých látek nalezeno v ethylacetátovém extraktu *Crinum erubescens* (AL-751).

## Abstract

Němečková, K.: Screening of biological activity of various species of the family Amaryllidaceae.

Diploma thesis, Charles University, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové, Department of pharmacognosy and pharmaceutical botany, Hradec Králové 2024, 70 p.

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

The family Amaryllidaceae is irreplaceable in the natural kingdom. In folk medicine it is used to deal with simple ailments such as colds and infections. The plant species of this family are abundant in nature, the core of the action are secondary metabolites. The most important metabolites are Amaryllidaceae alkaloids, which can be categorized into groups according to their basic structure. Majority of alkaloids belonging to the Amaryllidaceae family have similar effects and are therefore intensively studied, the most promising representatives have anticancer, antibacterial, antifungal, antiviral and antimalarial activity. The abilities of alkaloids to inhibit human cholinesterases, which may have neuroprotective effects especially on cognitive decline, have also been analyzed. Assessing the biological activity and revealing the presence of new alkaloids in selected plants was the aim of this thesis.

The species examined were *Crinum erubescens*, *Hippeastrum puniceum*, *Hippeastrum striatum* and *Hymenocallis occidentalis*. Their bulbs were used to make total ethanol extracts, from which alkaloid extracts were obtained by liquid-liquid extraction with chloroform and ethyl acetate. The extracts were subjected to GC-MS analysis to identify some of the alkaloids present. The alkaloid extracts were further tested for their inhibitory activity against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, which may be essential in the development of treatments for Alzheimer's disease. Extracts containing galanthamine were significantly more active against acetylcholinesterase. From a phytochemical point of view, most of the unknown compounds were found in the ethyl acetate extract of *Crinum erubescens* (AL-751).