

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton (Amaryllidaceae)

Izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita

Autor: Ivana Zelingerová

Vedoucí práce: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

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

Hradec Králové, září 2024

Ivana Zelingerová

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

.....

Ivana Zelingerová

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda vyjádřila poděkování vedoucí mé diplomové práce, PharmDr. Kateřině Hradiské Breiterové, Ph.D., za její odborné vedení, pomoc a ochotu jak při práci v laboratoři, tak při psaní práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli k realizaci této práce, a to především RNDr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D., za cennou pomoc s analytickými metodami a doc. PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, Ph.D., za pomoc při flash chromatografii. Za změření a interpretaci NMR spekter izolovaných látek děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. Na závěr bych chtěla poděkovat rodině a kamarádům za podporu.

Tato práce vznikla za podpory projektu Specifického vědeckého výzkumu Univerzity Karlovy, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové (SVV 260 662).

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD	10
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 Sekundární metabolity	13
3.2 Alkaloidy	14
3.3 Čeleď Amaryllidaceae	17
3.3.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů	18
3.3.2 <i>Narcissus</i> L.	20
3.3.3 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	21
3.3.4 Alkaloidy homolykorinového strukturního typu	23
3.3.5 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Carlton	25
3.4 Alzheimerova choroba	28
3.4.1 Amyloidní hypotéza	30
3.4.2 Tau hypotéza	31
3.4.3 Cholinergní hypotéza	32
3.4.4 Glutamátergní hypotéza	33
3.4.5 Mitochondriální hypotéza	33
3.4.6 Hypotéza oxidačního stresu	33
3.4.7 Hypotéza neurozánětu	34
3.4.8 Inzulinová teorie	34
3.4.9 Role GSK-3	34
3.4.10 Terapie AD	35
3.5 Protinádorová aktivita	40
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.1 Rostlinný materiál	42
4.2 Materiál a laboratorní vybavení	42
4.2.1 Rozpouštědla, chemikálie	42
4.2.2 Detekční činidla	43
4.2.3 Přístrojové vybavení	43
4.2.4 Databáze použité k vyhodnocení výsledků	43
4.2.5 Chromatografické sorbenty	43
4.2.6 Vytvájecí soustavy pro TLC	44

4.2.7	Pomocný materiál.....	44
4.3	Obecné postupy	44
4.3.1	Rozpouštění vzorku	44
4.3.2	Analytické TLC	45
4.3.3	Detekce alkaloidů	45
4.3.4	Příprava preparativních litých desek.....	45
4.3.5	Preparativní TLC	45
4.3.6	Eluce	46
4.3.7	GC-MS analýza	46
4.3.8	LC-MS analýza	46
4.3.9	Preparativní LC-MS analýza	47
4.3.10	Optická otáčivost	47
4.4	Stanovení biologické aktivity izolovaných alkaloidů.....	48
4.4.1	Stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám.....	48
4.4.2	Stanovení inhibiční aktivity vůči POP	49
4.4.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β	49
4.4.4	Stanovení cytotoxicity	50
4.5	Izolace alkaloidů	51
4.5.1	Frakce Ft.....	51
4.5.2	Frakce Fi, Fj3, Narc/2.....	55
5	VÝSLEDKY.....	63
5.1	Strukturní analýza izolovaných alkaloidů.....	63
5.1.1	IZ-1: Homolykorin	63
5.1.2	IZ-2: Galanthin.....	64
5.1.3	IZ-3: Lykorenin.....	65
5.2	Biologická aktivita izolovaných látek.....	66
5.2.1	Biologická aktivita izolovaných látek vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β	66
5.2.2	Cytotoxická aktivita izolovaných látek.....	66
6	DISKUSE A ZÁVĚR	67
7	ABSTRAKT	70
8	ABSTRACT	71
9	LITERATURA	72

SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ

Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	21
Tabulka 2: Souhrn vlastností schválených léčiv používaných v terapii AD	37
Tabulka 3 : Vyvíjecí soustavy použité pro TLC.....	44
Tabulka 4: Označení a navážka vzniklých podfrakcí po prvním dělení.....	51
Tabulka 5: Vzniklé podfrakce po dalším preparativním TLC.....	52
Tabulka 6: Přehled použitých standardů.....	52
Tabulka 7: Pořadí nanesených látek na porovnávací TLC desku č.1.....	53
Tabulka 8: Pořadí nanesených látek na porovnávací TLC desku č. 2.....	54
Tabulka 9: Eluční gradient použitý při flash chromatografii	56
Tabulka 10: Podfrakce a nově vzniklé frakce po flash chromatografii	57
Tabulka 11: Vzniklé podfrakce F7-1, F7- 2, F7-3 a jejich navážky	59
Tabulka 12: Vzniklé podfrakce F8-1, F8- 2, F8-3 a jejich navážky	59
Tabulka 13: Vzniklé podfrakce F8-3-1, F-8-3-2 a jejich navážky.....	60
Tabulka 14: Vzniklé podfrakce F9 a jejich navážky.....	61
Tabulka 15: Souhrn testovaných aktivit vůči enzymům spojeným s AD.....	66
Tabulka 16: Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči buňkám nádorových linií (viabilita buněk 48 hodin po ovlivnění alkaloidem při koncentraci 10 μ M).....	66

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zobrazení biosyntézy AA	19
Obrázek 2: Vybrané strukturní typy alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae	20
Obrázek 3: Zastoupení strukturních typů alkaloidů v <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	22
Obrázek 4: <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	23
Obrázek 5: Homolykorinové alkaloidy vyskytující se v <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	24
Obrázek 6: <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Carlton	26
Obrázek 7: Karltonin A Obrázek 8: Karltonin B	28
Obrázek 9: Zobrazení τ hypotézy	32
Obrázek 10: Porovnávací TLC deska č. 1 – porovnání podfrakce Ft-3-1, Ft-3-2, Ft-3-3 se standardy	53
Obrázek 11: Porovnávací TLC deska č. 2 - porovnání podfrakce Ft-5-2, Ft-5-3, Ft-5-4 se standardy.....	54
Obrázek 12: Průběh flash chromatografie	56

Obrázek 13: Souhrnné TLC vzniklých frakcích.....	57
Obrázek 14: Krystalizace při zpracování podfrakcí.	58
Obrázek 15: Kontrolní analytické TLC podfrakce F8-1, F8-2, F8-3. MF: S16.....	59
Obrázek 16: Kontrolní analytické TLC podfrakce F8-3-1, F8-3-2, MF: S17	60
Obrázek 17: HPLC-MS analýza krystalů získaných z frakce NC F9	61

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

22RV1	buněčná linie karcinomu prostaty
A2780	buněčná linie karcinomu vaječníku
A549	buněčná linie adenokarcinomu plic
AA	Amaryllidaceae alkaloidy
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
AMPA	(S)-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové receptory
ApoE4	apolipoprotein E4
APP	amyloidový prekurzorový protein
ARIA	abnormality v zobrazování související s amyloidem
ATP	adenosintrifosfát
A β	β -amyloid
BuChE	butyrylcholinesterasa
Caco-2	buněčná linie kolorektálního karcinomu
CAT	cholinacetyltransferasa
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CEM	buněčná linie T-lymfoblastů
CNS	centrální nervová soustava
cv.	kultivar
DR4	receptor smrti 4
DU145	buněčná linie karcinomu prostaty
EMA	Evropská léková agentura
eEF1A	translační elongační faktor
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
GIT	gastrointestinální trakt
GSK-3 β	glykogen synthasa kinasa 3 β

HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního čípku
HepG2	buněčná linie jaterního hepatocelulárního karcinomu
HL-60	buněčná linie akutní promyelocytární leukemie
HT-29	buněčná linie kolorektálního karcinomu
JURKAT	buněčná linie akutní leukémie T lymfocytů
K562	buněčná linie myeloidní leukemie
LNCaP	buněčná linie karcinomu prostaty
MCF7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MDA-MB-231	buněčná linie adenokarcinomu prsu
Molt 4	buněčná linie akutní lymfoblastické leukemie
MRC-5	buněčná linie zdravých plicních fibroblastů
N4OMT	norbelladin-4'- <i>O</i> -methyltransferasa
NMDA	N-methyl-D-aspartátové receptory
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PANC-1	buněčná linie epiteliálního karcinomu slinivky
PC-3	buněčná linie karcinomu prostaty
PPAR	agonisté receptoru aktivovaného peroxizomovým proliferátorem
POP	prolyloligopeptidasa
PP2A	protein fosfatasa 2A
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAOS-2	buněčná linie osteosarkomu
SH-SY5Y	buněčná linie neuroblastomu
SW1573	buněčná linie karcinomu plic
T47 D	buněčná linie karcinomu prsu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 ÚVOD

Rostliny a přírodní produkty mají dlouhou historii v léčbě různých onemocnění a představují neocenitelný zdroj látek s různorodými chemickými strukturami a biologickými účinky. Tyto vlastnosti z látek přírodního původu činí důležitý zdroj inspirace pro vývoj nových léčiv [1].

Rostliny produkují široké spektrum látek, které jsou zodpovědné za jejich farmakologické vlastnosti. Rostlinné metabolity jsou organické sloučeniny, které lze rozdělit na primární a sekundární [2]. Sekundární metabolity jsou látky, které nejsou pro život organismu nezbytné, ale hrají roli v jeho interakci s okolím a podílejí se na ochraně rostlin před biotickými nebo abiotickými stresy [3].

Jednou z největších skupin sekundárních metabolitů jsou alkaloidy [4]. Ačkoliv lidé využívají rostliny obsahující alkaloidy již tisíce let, první samostatné sloučeniny odpovědné za jejich účinky byly izolovány a popsány až v 19. století, kdy Friedrich Sertürner poprvé izoloval morfin [5], [6]. Alkaloidy jsou nesmírně rozmanité z hlediska struktury a biologických účinků [4]. Některé čeledi rostlin, jako jsou například Papaveraceae, Ranunculaceae, Solanaceae a Amaryllidaceae, jsou na alkaloidy obzvláště bohaté [7].

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou známé obsahem sloučenin, nazývaných Amaryllidaceae či amaryllkovité alkaloidy, které jsou zajímavé díky svým rozmanitým biologickým vlastnostem, mezi něž patří antivirové, antimalarické, protinádorové a anticholinesterasové účinky [8].

Rod *Narcissus* L. je nejrozšířenější z čeledi Amaryllidaceae a zahrnuje přibližně 100 druhů [9]. Léčebné využití různých druhů rodu *Narcissus* L. sahá až do starověku. Slavní lékaři tohoto období, jako například Hippokrates z Kósu nebo Pedanius Dioskorides, doporučovali narcisový olej jako lék proti rakovině, zejména proti nádorům dělohy [10]. Většinu zástupců rodu *Narcissus* L. je možné snadno křížit a tento přístup se stal velmi populárním, v důsledku čehož bylo vyšlechtěno velké množství kultivovaných odrůd pro okrasné účely [9]. Kultivary narcisů jsou v hojné míře komerčně dostupné, což umožňuje jejich využití k izolaci biologicky aktivních látek, zejména alkaloidů [11].

Rod *Narcissus* L. rovněž poskytl jako první zdroj homolykorinových alkaloidů, jejichž unikátní strukturní uspořádání činí tyto sloučeniny atraktivními pro výzkum nových protinádorových léčiv [12].

Od izolace lykorinu z *N. pseudonarcissus* L. v roce 1877 bylo z rostlin čeledi Amaryllidaceae izolováno více než 500 alkaloidů. Mezi těmito alkaloidy je nejvýznamnější galanthamin, který je schválen pro farmakologickou léčbu Alzheimerovy choroby (AD) [8].

AD je celosvětově nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění s komplexní etiologií a mnohostrannou patofyziologií [9]. V rámci této práce je diskutováno několik hypotéz, které se podílejí na vzniku tohoto onemocnění. Stále rostoucí počet pacientů s AD zdůrazňuje nutnost hledání nových terapeutických možností [9].

Tato diplomová práce se zabývá izolací alkaloidů z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton a posouzením biologických aktivit izolovaných sloučenin ve spojitosti s potenciální léčbou neurodegenerativních či onkologických onemocnění.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

- 1) Vypracování odborné rešerše dle zadání školitele.
- 2) Zpracování zadané frakce za účelem izolace alespoň dvou alkaloidů v čistém stavu.
- 3) Strukturní identifikace izolovaných a připravených látek (MS, NMR apod. analýzy).
- 4) Příprava izolovaných látek pro co nejširší spektrum biologických aktivit.
- 5) Zpracování všech získaných výsledků, jejich analýza a vyhodnocení.
- 6) Sepsání a odevzdání diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Sekundární metabolity

V rostlinách se nachází řada obsahových látek. Mimo primární metabolity, které jsou klíčové pro život organismu a podílejí se přímo na růstu, výživě, fotosyntéze a dýchání, můžeme v rostlinách nalézt i sekundární metabolity. Tyto metabolity nejsou nezbytné pro život organismu, ale zastávají funkce, které v dlouhodobém hledisku pomáhají organismu v přežití. Sekundární metabolity jsou strukturně i biologicky velmi rozmanitá skupina látek, které mohou být produkovány nejen rostlinami, ale i bakteriemi, houbami či živočichy [13].

Funkce sekundárních metabolitů je různorodá. Ochraňují organismus před býložravými živočichy, hmyzem, bakteriemi či škodlivými houbami. Zároveň ochraňují rostlinu před nepříznivými podmínkami jako je teplota, vlhkost či světlo. Pro mnoho organismů jsou sekundární metabolity, jako například alkaloidy či kyanogenní glykosidy, toxické. Rostliny této toxicity využívají ve svůj prospěch [3].

Sekundární metabolity nemusí mít pouze ochrannou funkci. Mohou plnit signální funkci, kdy slouží jako atraktanty pro opylovače a přispívají tím k opylení či roznášení semen. Příkladem mohou být barevné anthokyany, karotenoidy či vonné monoterpeny [14]. Je možné se setkat se sloučeninami, které zastávají funkci jak obrannou, tak signální. Příkladem mohou být anthokyanová barviva, která lákají opylovače a zároveň působí jako antioxidanty, jež zmírňují fotooxidační poškození listů tím, že vycytávají volné radikály a reaktivní formy kyslíku (ROS) [14], [15].

Metabolity mohou být v rostlinách obsaženy v aktivní nebo neaktivní formě. V druhém případě přecházejí z neaktivní na aktivní formu až po vzniklém poranění, nebo dokonce mohou vznikat *de novo* – např. fytoalexiny [16].

Některé sekundární metabolity nejsou konečnými produkty metabolismu a mohou být dále využity v biogenetických procesech. Příkladem mohou být iridoidní monoterpeny, které jednak mohou být finální produkt metabolismu anebo mohou vstupovat do biosyntézy alkaloidů a stát se součástí alkaloidní struktury, jako je tomu tak například u ajmalinu či ibogainu [14].

Sekundární metabolity mohou být kořenovým systémem ve formě exudátu vylučovány do rhizosféry. V exudátu byla popsána například přítomnost fytoalexinů, jejichž funkcí je ochrana rostlin před stresem, nebo fytoanticipiny, které působí antimikrobiálně. Pomocí vylučovaného exudátu mohou rostliny ovlivňovat půdní okolí. Metabolity, které se vyskytují v exudátu, mají vliv na chemické reakce, jež probíhají v půdě, a na organismy žijící v blízkosti kořenů. Vylučované látky tak pomáhají rostlině v boji proti patogenům nebo napomáhají ke komunikaci s okolím, čímž hrají důležitou roli v mezidruhové kompetici [17].

Produkce sekundárních metabolitů může být ovlivněna prostředím, ve kterém se rostlina vyskytuje. Mnoho stresových podmínek, jako je například poranění, teplota, vlhkost nebo intenzita záření, indukuje produkci sekundárních metabolitů [4]. UV záření je dalším z faktorů, který může stimulovat produkci těchto metabolitů. Tento jev byl studován u buněčných kultur rostliny *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, jež byly ozařovány UV-B zářením, přičemž reakcí bylo zvýšení produkce metabolitů, a to konkrétně catharanthinu a vindolinu [18].

U víceletých druhů rostlin nalezneme sekundární metabolity převážně v cibulích, kořenech, oddencích či ve stoncích. Biosyntéza většinou probíhá pouze v jednom orgánu, ale sekundární metabolity lze detekovat i v dalších rostlinných tkáních [3].

Význam sekundárních metabolitů je komplexní a přispívá k plnohodnotnému životu rostlin [14].

3.2 Alkaloidy

Alkaloidy představují jednu z největších a nejrozmanitějších skupin sekundárních metabolitů [5]. Zahrnují přes 12 000 přírodních produktů [19]. I přesto, že rostliny obsahující alkaloidy používá lidstvo několik tisíc let, byly první z těchto biologicky aktivních sloučenin poprvé charakterizovány a izolovány až v 19. století [5].

Navzdory své strukturní rozmanitosti mají alkaloidy několik společných chemických a fyzikálních vlastností. Jsou to nízkomolekulární látky, které se vyznačují bazickým charakterem. Hlavním společným znakem je přítomnost jednoho či více atomů dusíku [4], [20]. Dusík se může vyskytovat ve formě primárního, sekundárního či terciárního aminu [20]. Některé alkaloidy obsahují kvarterní atom dusíku [21]. Často bývá dusík součástí heterocyklu, ovšem ne vždy tomu tak je [20].

Díky přítomnosti dusíku jsou alkaloidy bazické. Bazicitu ovlivňuje i umístění dalších funkčních skupin v molekule. Většina alkaloidů jsou pevné, krystalické látky. Existují i alkaloidy vyskytující se v kapalné formě jako například koniin či nikotin. Kapalné formy většinou postrádají ve své struktuře kyslík. Díky svému zásaditému charakteru mohou alkaloidy tvořit soli s minerálními či organickými kyselinami. V rostlinách se mohou alkaloidy vyskytovat buď ve volném stavu, jako soli nebo jako N-oxidy. Alkaloidy jsou nerozpustné ve vodě a více či méně rozpustné v organických rozpouštědlech, kdežto jejich soli jsou naopak ve vodě rozpustné a v organických rozpouštědlech nerozpustné [5].

Hlavní funkce alkaloidů je připisována ochraně před býložravci. Po požití mohou alkaloidy ovlivnit různé metabolické dráhy. Mechanismus toxicity se může mezi jednotlivými alkaloidy lišit. Mohou působit ovlivněním fyziologických procesů, inhibicí syntézy DNA či mohou ovlivnit nervový systém. Toxicitických vlastností, které lze pozorovat při obranném mechanismu rostlin, se dá využít i při výzkumu nových léčiv. Specifické toxicity může být využíváno v boji proti určitým typům nádorových buněk [4].

Alkaloidy mají atom dusíku, který přijímá proton, a jeden či více atomů aminového vodíku, jež proton darují. Díky tomu mohou vytvářet vodíkové vazby s enzymy či se vázat na receptory. To společně s častou přítomností dalších funkčních skupin, které mají rovněž proton akceptující či proton donorující vlastnosti, vysvětluje biologickou aktivitu alkaloidů [20]. Biologická aktivita alkaloidů je pestrá. Vykazují široké spektrum farmakologických účinků – od analgetických, antioxidačních, antihypertenzních, antiemetických až po protinádorové, imunomodulační či antivirové [5], [20].

Na druhou stranu, alkaloidy mohou být pro lidi i vysoce toxické. Bylo zaznamenáno několik případů otrav alkaloidy u lidí. Toxické účinky vykazují například tropanové alkaloidy jako atropin, hyoscyamin či skopolamin [22], [23]. Mají silné anticholinergní účinky a fungují jako kompetitivní antagonisté acetylcholinu (ACh) na muskarinových receptorech [24]. Při intoxikaci tropanovými alkaloidy dochází k zvýšení dechové a srdeční frekvence, mydriáze, suchosti v ústech, průjmu, nastává zmatenost, halucinace, křeče a v těžkých případech smrt v důsledku respiračního selhání [25].

Mezi další skupinu alkaloidů, které vykazují toxicitu, patří piperidinové alkaloidy. Známá rostlina *Conium maculatum* L. obsahuje několik piperidinových alkaloidů jako je koniin, γ -konicein a N-methylkoniin. Tyto alkaloidy způsobují paralýzu svalstva v důsledku blokády

nervosvalových spojů. Akutní intoxikace se projevuje svalovou slabostí, tachykardií až úmrtím způsobeným respiračním selháním [24], [25].

Pyrrrolizidinové alkaloidy byly identifikovány jako hepatotoxické a karcinogenní. Důvodem jsou jaterní oxidasy savců. Tyto enzymy přeměňují pyrrrolizidinové alkaloidy na reaktivní pyrrolové struktury, které alkylují nukleové kyseliny a proteiny [20]. V neposlední řadě lze zmínit skupinu námelových alkaloidů, které stojí za otravou mnoha lidí ve středověku [26]. Dalšími příklady toxických alkaloidů jsou například kardiotoxický akonitin, enterotoxický lykorin či neurotoxický strychnin [20].

Alkaloidy bývají zneužívány i jako rekreační drogy. Typickými zástupci jsou nikotin, kokain či psilocybin [7].

Alkaloidy jsou rozmanité sloučeniny, a to jak svým botanickým původem, strukturou, farmakologickým účinkem tak i biochemickým původem [27]. Existují různé klasifikační systémy. Můžeme je klasifikovat dle jejich biosyntetické cesty, chemické struktury či taxonomické skupiny [28]. Lze je rozdělit do tří skupin podle jejich biosyntetického původu – pravé alkaloidy, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy [27].

Biosyntéza pravých alkaloidů vychází z aminokyselin a dusík mají vázaný v heterocyklu. Nejčastější prekurzorové aminokyseliny jsou například L-tyrosin, L-fenylalanin, L-ornitin, L-histidin či L-lysin [27]. Příkladem pravých alkaloidů je nikotin či morfin [29].

Protoalkaloidy mají rovněž ve své molekule dusík, který pochází z aminokyselin, ale není součástí heterocyklu. L-tryptofan a L-tyrosin patří mezi hlavní prekurzory tohoto typu alkaloidů [27]. Jako zástupce protoalkaloidů lze uvést například efedrin či meskalin [19].

Pseudoalkaloidy obsahují heterocyklický kruh s dusíkem, ale nejsou odvozeny od aminokyselin [19]. Typickými zástupci pseudoalkaloidů jsou například purinové alkaloidy – kofein, theobromin či theofylin [19], [27].

Dále můžeme alkaloidy klasifikovat na základě struktury kruhu, a to například na tropanové, purinové, pyrrrolizidinové, piperidinové, chinolinové, isochinolinové, indolové, imidazolové [27]. Mezi čeledě bohaté na alkaloidy patří zejména Amaryllidaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Fabaceae, Gnetaceae, Lauraceae, Liliaceae,

Loganiaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae a Solanaceae [27].

3.3 Čeleď Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae zahrnuje přibližně 85 rodů a 1100 druhů rostlin [30]. Do této čeledi spadají známé rody jako například *Narcissus* L., *Galanthus* L., *Leucojum* L., *Crinum* L., či *Amaryllis* L. [14]. Typický výskyt této čeledi je zejména v tropických a subtropických oblastech Jižní Afriky a Jižní Ameriky. V České republice nalezneme nejčastěji zástupce narcisů, sněženek či bledulí [31]. Sněženka podsněžník (*Galanthus nivalis* L.) a bledule jarní (*Leucojum vernum* L.) jsou v České republice chráněné zákonem [14], [32].

Rostliny této čeledi jsou hojně pěstovány jako okrasné rostliny pro své krásné květy [33]. Tvoří tak důležitou část květinového průmyslu [34]. Kromě okrasného využití se rostliny z čeledi Amaryllidaceae používají již několik tisíc let v tradiční medicíně jako léčivé rostliny [33]. K léčbě nádorů dělohy byl olej z *Narcissus poeticus* L. používán již ve 4. století př.n.l. [31].

Společný znak, který doprovází tuto čeleď, je výskyt typických alkaloidů. Tyto alkaloidy jsou označovány jako Amaryllidaceae alkaloidy (AA). AA jsou rozmanitou skupinou isochinolinových alkaloidů, produkovaných výhradně rostlinami z čeledi Amaryllidaceae [35]. Doposud bylo z rostlin Amaryllidaceae izolováno přes 600 strukturně rozlišných alkaloidů [30]. Od roku 1877, kdy byl izolován z *Narcissus pseudonarcissus* L. alkaloid lykorin, došlo k významnému rozvoji ve výzkumu obsahových látek rostlin z této čeledi [36].

Přítomnost AA je zodpovědná za rozmanitou biologickou aktivitu, kterou se rostliny z této čeledi vyznačují. Lze uvést aktivity, jako například protinádorovou, antibakteriální, antioxidační, antiparazitickou, antifungální, protizánětlivou nebo i inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám. [34].

Mezi nejznámější alkaloid získávaný z této čeledi patří galanthamin. Původně byl izolován z *Galanthus woronowii* Losinsk., ale lze jej v majoritním zastoupení nalézt i v dalších rostlinách této čeledi. Jedná se o reverzibilní kompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy (AChE), který se zároveň váže na alosterická místa nikotinových receptorů, čímž zvyšuje dostupnost ACh. Galanthamin byl v roce 2001 schválen FDA pro léčbu Alzheimerovy choroby [35]. V návaznosti na úspěšnost galanthaminu je čeleď Amaryllidaceae dlouhodobě intenzivně zkoumána jako

potenciální zdroj nových inhibitorů AChE. Bylo již objeveno více zástupců AA s významnou inhibiční aktivitou vůči AChE, ale žádný nebyl schválen pro klinické studie. Dalším nadějným alkaloidem této čeledi je například lykorin, který se vyznačuje silnou protinádorovou aktivitou. Jeho špatná rozpustnost ve vodě ovšem limituje klinické použití [30].

Mimo alkaloidy je možné v taxonech čeledi Amaryllidaceae nalézt i další obsahové látky, jako jsou chalkony, flavonoidy, lektiny, lignany, peptidy a terpenoidy. V této čeledi ovšem nenalezneme steroidní saponiny [34].

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae stále představují zdroj zajímavých látek, zejména již zmiňovaných alkaloidů. Čeleď je i nadále na vzestupu, a to i kvůli neustálému šlechtění nových kultivarů. Budoucí výzkum by měl být věnován minoritním alkaloidním složkám, mezi nimiž je vyšší šance na objevení nových struktur. Také je do budoucna možnost pokročit k využívání stále citlivějších detekčních metod jako UPLC-MS/MS a UPLC-NMR. Existují určité obavy ohledně udržitelnosti zástupců čeledi Amaryllidaceae, zejména kvůli ztrátě přirozeného prostředí v důsledku urbanizace a změn v krajině [30], [34].

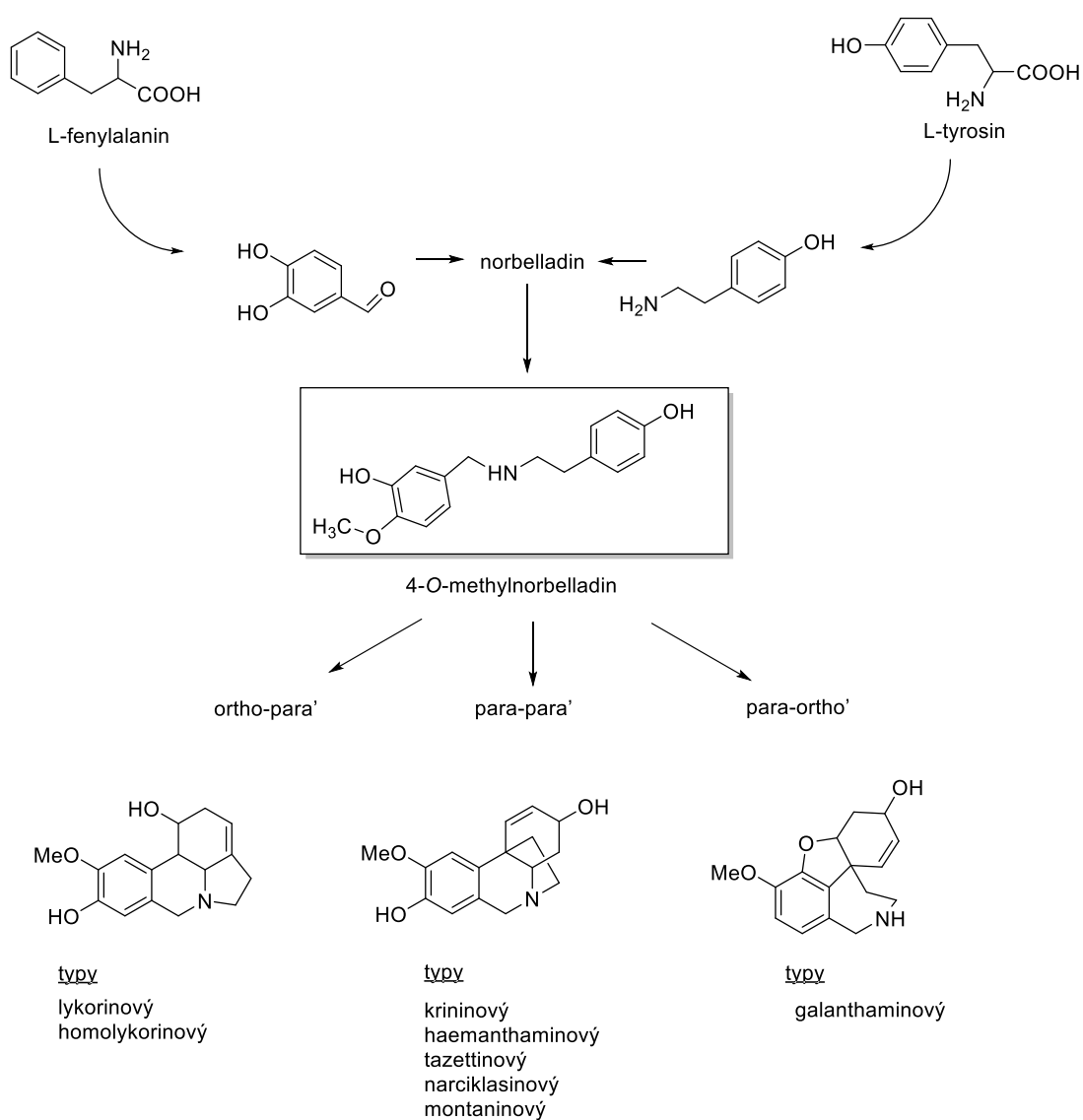
3.3.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů

AA jsou odvozeny od aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu, z kterých následně vzniká společný prekurzor 4'-O-methylnorbelladin [37]. Aromatické aminokyseliny pocházejí z primárního metabolismu a jsou syntetizovány prostřednictvím šikimátové dráhy [38]. Fenylalanin je pomocí fenylalaninamoniaklyasy (PAL) přeměňován na kyselinu skořicovou, zatímco tyrosin je dekarboxylován tyrosindekarboxylasou za vzniku tyraminu. Kyselina skořicová se dále rozkládá za vzniku protokatechového aldehydu (3,4-dihydroxybenzaldehyd) a jeho kondenzací s tyraminem vzniká meziprodukt Schiffovy báze, který po redukci vede ke vzniku norbelladinu. Norbelladin je methylován na 4'-O-methylnorbelladin. Reakce je katalyzována pomocí norbelladin-4'-O-methyltransferasy (N4OMT). 4'-O-methylnorbelladin je klíčový meziprodukt, který je výchozím bodem komplexní biosyntetické dráhy [37], [38], [39].

Dalším krokem je cyklizace C-C fenolové vazby 4'-O-methylnorbelladinu, která může probíhat třemi alternativními způsoby. Může docházet ke spojení para-ortho' vedoucí k alkaloidům galanthaminového typu; ortho-para' fenolové spojení, které vede k alkaloidům lykorinového a lykoreninového typu; a para-para' spojení vedoucí k alkaloidům krininového, narciklasinového, tazettinového a montaninového typu [38]. Tyto struktury jsou dále chemicky

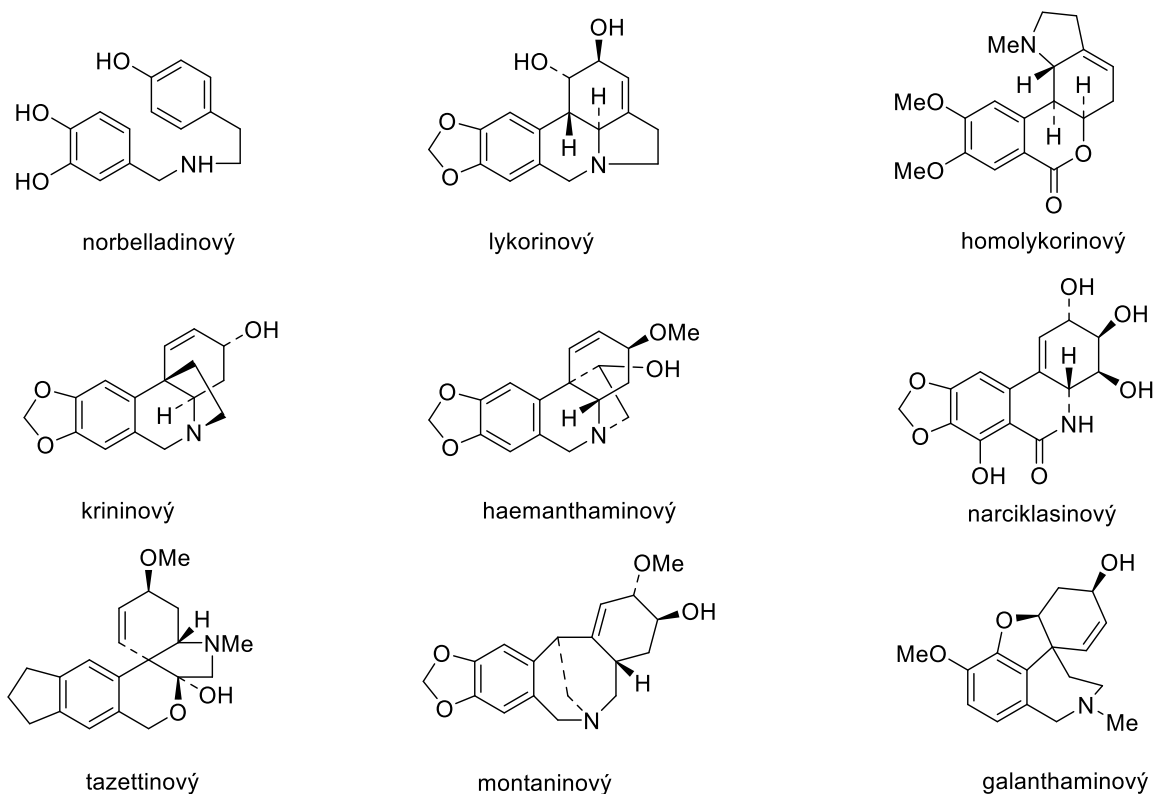
modifikovány prostřednictvím hydroxylačných, oxidačných, redukčných, metylačných a demetylačných reakcí, čímž vzniká rozmanité spektrum alkaloidů různých strukturních typů [39].

Spojení fenolových kruhů k vytvoření klíčových meziproductů zahrnuje odstranění vodíku z fenolu, po němž následuje delokalizace nepárového elektronu přes rezonanční formy, kde je volný elektron rozptýlen v ortho a para pozicích vzhledem k původnímu kyslíku. Fenolové radikály vzniklé tímto způsobem jsou stabilizovány spojením s dalšími radikály a spojením dvou těchto rezonančních struktur v různých kombinacích vzniká řada dimerních systémů [38]. Průběh biosyntézy je zobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1: Zobrazení biosyntézy AA [36], [37].

Jak již bylo dokázáno galanthaminem, který je komerčně využíván pro léčbu Alzheimerovy choroby, mají AA velký farmaceutický potenciál. Rostliny čeledi Amaryllidaceae vykazují specifické složení alkaloidů a obvykle se u nich vyskytují majoritní a minoritní typy alkaloidů. Specifické složení alkaloidů u různých druhů této čeledi je pravděpodobně dáno důsledkem rozdílů na úrovni exprese a substrátové specifičnosti zúčastněných biosyntetických enzymů. Velkoprodukce těchto alkaloidů je nákladná a ekologicky náročná, proto existují rostlinné technologie *in vitro*, jako například buněčné či tkáňové kultury nebo genetické inženýrství, které jsou perspektivními alternativami. Pro rozvoj těchto metod je nezbytné důkladnější pochopení biosyntetických drah AA [38]. Biosyntézou dochází ke vzniku několika základních strukturních typů. Příklad hlavních strukturních typů je uveden na obrázku 2.



Obrázek 2: Vybrané strukturní typy alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae [36].

3.3.2 *Narcissus* L.

Rod *Narcissus* L., je významný rod čeledi Amaryllidaceae. Zahrnuje zhruba 100 druhů. Jak již bylo zmíněno výše, většina zástupců čeledi Amaryllidaceae roste především v tropech a subtropích, nicméně výskyt rodu *Narcissus* L. je soustředěný převážně v severní Africe, středomoří a jihozápadní Evropě [40].

Zástupci tohoto rodu byli v historii používáni v tradiční medicíně a lidovém léčitelství. Olej vyráběný z *Narcissus* L. byl používán při léčbě nádorů dělohy. Arabové využívali tento olej při alopecii či jako afrodiziakum. Dále byl *Narcissus* L. doporučován při léčbě ran, ztuhlých a bolestivých kloubů nebo namožených šlach [36].

U tohoto rodu je často možné se setkat s hybridizací. Tímto způsobem bylo vyšlechtěno velké množství kultivarů, přičemž Mezinárodní registr narcisů skýtá přes 27 000 jmen kultivarů rodu *Narcissus* L. [41]. Ve většině případů jsou vznikající kultivary větší a robustnější než jejich rodičovské rostliny [36]. Mimo okrasné účely jsou některé kultivary i bohatým zdrojem AA. Vybrané kultivary jsou výhodné pro komerční produkci alkaloidů, protože jsou dostupné ve velkém měřítku. Kultivar *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton je pěstován pro komerční extrakci galanthaminu, a to kvůli vysoké koncentraci tohoto alkaloidu v cibulích, velkým rozměrům cibulí a snadné dostupnosti [40].

Z rostlin rodu *Narcissus* L. bylo izolováno přes 100 alkaloidů různých strukturních typů. Nejčastěji zastoupené jsou alkaloidy lykorinového či homolykorinového typu [42].

Narcisy jsou na jaře kvetoucí rostliny s podzemní cibulí. Jejich životní cyklus zahrnuje období letního klidu cibulí, které nastává po opadu listů. Dormance umožňuje zachování vlhkosti, zásob sacharidů a sekundárních metabolitů [43].

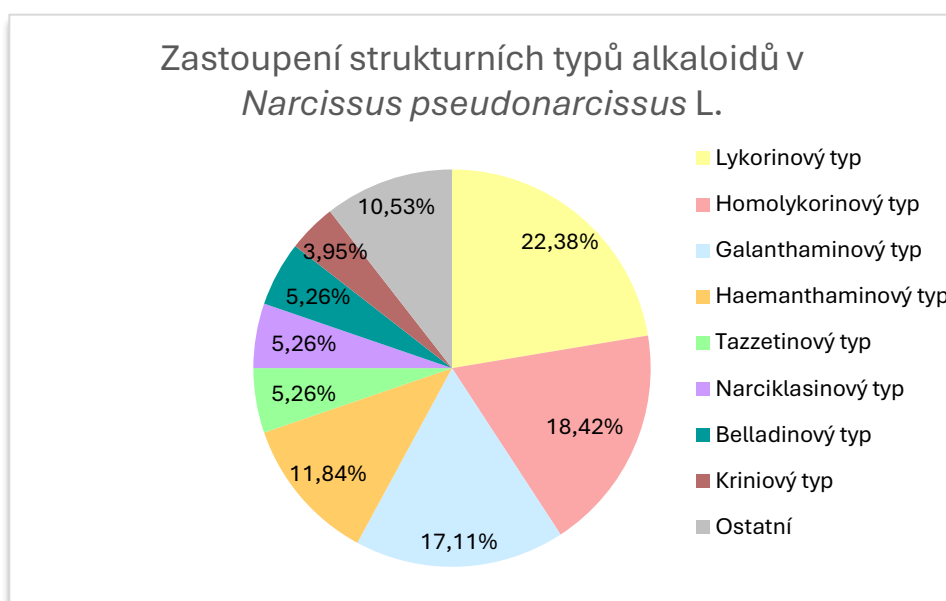
3.3.3 *Narcissus pseudonarcissus* L.

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace *Narcissus pseudonarcissus* L. [44]

Říše	Plantae (rostliny)
Kmen	Magnoliophyta (krytosemenné)
Třída	Liliopsida (jednoděložné)
Řád	Asparagales (chřestotvaré)
Čeleď	Amaryllidaceae (amarylkovité)
Podčeleď	Amaryllidoideae (amarylkové)
Rod	<i>Narcissus</i> L. (narcis)
Druh	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. (narcis žlutý)

Narcissus pseudonarcissus L., často nazývaný jako „divoký narcis“, je jedním ze známých široce rozšířených volně rostoucích druhů rodu *Narcissus* L. Kromě okrasného významu jsou

rostliny *N. pseudonarcissus* L. zajímavé i kvůli přítomnosti obsahových látek, a to zejména alkaloidů lykorinového, homolykorinového, galanthaminového, tazettinového a haemanthaminového typu [45]. Zastoupení strukturních typů alkaloidů v *Narcissus pseudonarcissus* L. je zobrazeno na obrázku 3. Alkaloidy izolované z *N. pseudonarcissus* L. se nejčastěji vyskytují ve formě terciárních bazí. Existují ale případy, kdy byly nalezeny ve formě kvarterních bazí, dimerů či N-oxidů. Kromě alkaloidů můžeme v *N. pseudonarcissus* L. nalézt i další látky jako například flavonoidy, fenolické látky, terpenoidy či těkavé sloučeniny [45].



Obrázek 3: Zastoupení strukturních typů alkaloidů v *Narcissus pseudonarcissus* L. [45].

Botanicky se rostliny druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. (obrázek 4) skládají z vejčitých cibulí s vnějšími hnědými blanitými šupinami, které nesou páskovité, vzpřímené, úzké a oboustranně souměrné listy. Mají mírně šedozelenou barvu a tupou špičku. Cibule tohoto druhu vykvétají podle odrůdy obvykle na počátku či uprostřed jara a vytvářejí pohárkovité, oboupohlavné květy, které jsou nesené na vzpřímeném stvolu. Květy pohárkovitého tvaru jsou se světle žlutým okvětím a tmavší střední trubkou, zatímco jejich pakorunka je sytější žlutá. Plodem je obvejčitá, kulatě trojhranná tobolka obsahující malá černá semena [45], [46].



Obrázek 4: *Narcissus pseudonarcissus* L. [47]

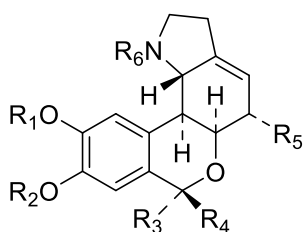
3.3.4 Alkaloidy homolykorinového strukturního typu

Jeden z hlavních strukturních typů AA, který se v *Narcissus pseudonarcissus* L. vyskytuje, je typ homolykorinový. Tento typ alkaloidů nebyl zaznamenán u některých kmenů čeledi Amaryllidaceae jako například u Hemantheae nebo Amaryllideae, což zdůrazňuje jejich přítomnost jako charakteristický chemotaxonomický rys kmene Narcisseae [36]. Některé alkaloidy homolykorinového typu, jako 6-*O*-ethyllykorenin nebo 8-*O*-demethyl-6-*O*-methyllykorenin, byly dokonce poprvé zaznamenány v *Narcissus pseudonarcissus* L. [45].

Homolykorinové alkaloidy se vyznačují tetracyklickým 2-benzopyrano-[3,4-*g*] indolovým skeletem. Přes ortho-para-fenolovou oxidativní vazbu 4'-*O*-methylnorbelladinu vzniká lykoreninový typ, z kterého se následně restrukturalizací tvoří typ homolykorinový. Tetrahydromasonin (14) je výjimečný tím, že v jeho struktuře dochází k otevření tetrahydropyranového kruhu B [45].

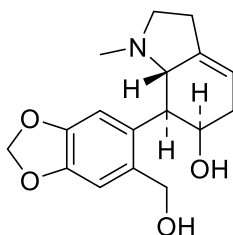
Obecně můžeme homolykorinové alkaloidy rozdělit do dvou skupin, a to v závislosti na nasycení vazby C3-C4. Většina má přítomnou dvojnou vazbu C3-C4 a vykazuje cis-B/C kruhové spojení [48].

Z *N. pseudonarcissus* L. bylo izolováno 14 strukturně rozmanitých alkaloidů homolykorinového typu (obrázek 5). Z chemického hlediska se tyto alkaloidy s homolykorinovým skeletem vyskytují buď jako laktony (např. hippeastrin, homolykorin, 8-*O*-demethylhomolykorin, 9-*O*-demethylhomolykorin, masonin a normasonin), hemiacetaly (např. lykorenin, odulin) nebo cyklické etherové alkaloidy (např. eugenin, 6-*O*-methyllykorenin, 6-*O*-ethyllykorenin, 6-*O*-ethylodulin). Všichni zástupci homolykorinových alkaloidů získaných z *N. pseudonarcissus* L. jsou terciární báze, ovšem s výjimkou normasoninu, který obsahuje sekundární aminoskupinu [45].



- 1) Eugenin
- 2) Hippeastrin
- 3) Homolykorin
- 4) 8-*O*-Demethylhomolykorin
- 5) 9-*O*-Demethylhomolykorin
- 6) Lykorenin
- 7) 6-*O*-Methyllykorenin
- 8) 6-*O*-Ethyllykorenin
- 9) 8-*O*-Demethyl-6-*O*-Methyllykorenin
- 10) Masonin
- 11) Normasonin
- 12) Odulin
- 13) 6-*O*-Methylodulin

- 1) $R_1=R_6=Me, R_2=R_3=R_5=H, R_4=OEt$
- 2) $R_1+R_2=CH_2, R_3+R_4=O, R_5=OH, R_6=Me$
- 3) $R_1=R_2=R_6=Me=R_3+R_4=O, R_5=H$
- 4) $R_1=R_6=Me, R_2=R_5=H, R_3+R_4=O$
- 5) $R_1=R_5=H, R_2=R_6=Me, R_3+R_4=O$
- 6) $R_1=R_2=R_6=Me, R_3=OH, R_4=R_5=H$
- 7) $R_1=R_2=R_6=Me, R_3=OMe, R_4=R_5=H$
- 8) $R_1=R_2=R_6=Me, R_3=OEt, R_4=R_5=H$
- 9) $R_1=R_6=Me, R_2=R_4=R_5=H, R_3=OMe$
- 10) $R_1+R_2=CH_2, R_3+R_4=O, R_5=H, R_6=Me$
- 11) $R_1+R_2=CH_2, R_3+R_4=O, R_5=R_6=H$
- 12) $R_1+R_2=CH_2, R_3=OH, R_4=R_5=H, R_6=Me$
- 13) $R_1+R_2=CH_2, R_3=OMe, R_4=R_5=H, R_6=Me$



14) Tetrahydromasonin

Obrázek 5: Homolykorinové alkaloidy vyskytující se v *Narcissus pseudonarcissus* L. [45]

Homolykorinové alkaloidy byly studovány i z hlediska jejich biologické aktivity. Některé alkaloidy této skupiny mají inhibiční vliv vůči různým liniím nádorových buněk, jako je například linie lymfomu Molt 4, lidského hepatomu HepG2, lidského karcinomu prostaty LNCaP či adenokarcinomu tlustého střeva HT-29. Bohužel působí cytotoxicky i na některé linie nenádorových buněk [12], [36]. Dále lze zmínit antimykotickou aktivitu vůči *Candida albicans* či antivirovou aktivitu vůči *Herpes simplex*, kterou vykazuje hippeastrin [31]. Rovněž bylo zjištěno, že hippeastrin je potenciální inhibitor cyklin-dependentní kinasy 1 (CDK1), čehož lze využít u protinádorové léčby [49]. CDK1 patří mezi serin/threonin specifické proteinkinasy, které se podílí na regulaci buněčného cyklu a diferenciaci buněk. CDK1 hraje důležitou roli v procesu nádorového bujení [50].

Mezi další zajímavé účinky, které byly objeveny u této skupiny alkaloidů je inhibiční potenciál vůči glykogen syntase kinase-3 β (GSK-3 β). Ve studii bylo zjištěno, že nejvyšší inhibiční účinek vůči GSK-3 β vykazuje z homolykorinových alkaloidů zejména masonin a 9-*O*-demethylhomolykorin [51].

3.3.5 *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton

Rozličné kultivary rostlin jsou výsledkem šlechtění. Šlechtění je proces, jehož cílem je zlepšovat nebo upravovat vlastnosti dané rostliny. Jedná se zejména o upřednostňování výhodných vlastností, kam může spadat například zvyšování odolnosti vůči nemocem, zlepšování výnosů, tolerance vůči abiotickým stresům atd. Šlechtění rostlin vychází z genetických poznatků, jejichž základy definoval Johann Gregor Mendel [52], [53]. Při šlechtění je uplatňován umělý výběr. Umělý výběr je výběr žádoucích vlastností a opatření, které jsou podniknuty za účelem zachování vítaných vlastností v budoucích generacích. Výběr je prováděn lidmi primárně na základě fenotypových znaků šlechtěných jedinců. Funguje na stejném principu jako přírodní výběr s tím rozdílem, že nerozhoduje příroda, ale člověk. Umělý výběr je pro člověka výhodný, jelikož je rychlejší než přírodní výběr a umožňuje člověku formovat organismy podle svých potřeb [54].

Kultivar *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton (obrázek 6) [55] se vyznačuje vysokým obsahem galanthaminu, mimořádnou velikostí cibulí, která činí 4-5 cm v průměru, širokou dostupností a vitalitou [43]. Stejně jako většina kultivarů, patří i tento mezi tetraploidy, což může být vysvětlením jeho vitality [37]. Polyploidie je jev, při kterém dochází k znásobení chromozomových sad v buňkách. Často se vyskytuje zdvojnásobení diploidní sady na

tetraploidní. Bylo zjištěno, že u rostlin vede polyploidizace k jejich většímu růstu, rychlejšímu vývoji a vyšší produkci ve srovnání s diploidními variantami [56].



Obrázek 6: *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton [55].

Jak již bylo zmíněno, z důvodu těchto příznivých vlastností je *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton využíván jako hlavní komerční zdroj galanthaminu. Organická syntéza galanthaminu je sice možná, avšak je spojena s nákladností a náročností [57]. Ve střední a západní Evropě je galanthamin získáván především z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, zatímco ve východní Evropě slouží jako zdroj galanthaminu *Leucojum aestivum* L. [58]. Mnoho přirozených stanovišť *L. aestivum* L. se zmenšilo nebo je ohroženo kvůli rostoucí poptávce farmaceutických podniků [59]. V Číně je galanthamin získáván z *Lycoris radiata* L. V Uzbekistánu a Kazachstánu je zdrojem *Ungernia victoria* L. [60].

Vysoké koncentrace galanthaminu byly zjištěny i v ostatních druzích či kultivarech narcisů. Příkladem může být *Narcissus confusus* Pugsley, který zároveň vykazuje i zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE a butyrylcholinesterase (BuChE) [58].

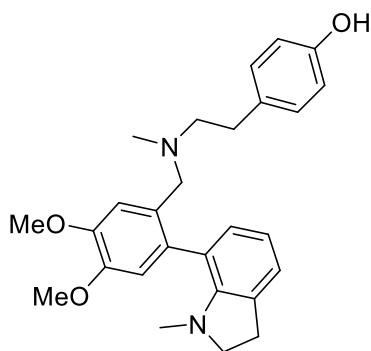
U kultivaru *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton byly provedeny různé studie zkoumající vliv určitých faktorů na obsah galanthaminu. Byla provedena studie, která zkoumala vliv stáří cibulí na obsah galanthaminu, přičemž bylo zjištěno, že obsah alkaloidu je nejvyšší

ve dvouletých cibulích. Zároveň byl zkoumán vliv místa pěstování. Největšími producenty cibulí narcisů jsou Nizozemsko a Velká Británie. Přibližně 70 % celosvětové produkce cibulí pochází z těchto dvou zemí [61]. Bylo dosaženo závěru, že obsahy alkaloidů v cibulích stejné odrůdy pěstované na různých místech se sice mírně liší, ale rozdíly nejsou významné [62].

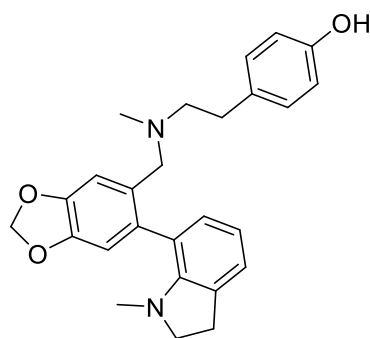
Jiné studie se zabývaly produkcí alkaloidních látek v závislosti na použití dusíkatých hnojiv. Jelikož jsou alkaloidy většinou odvozeny z aminokyselin, existoval obecný předpoklad, že vyšší dostupnost dusíku může zvýšit produkci alkaloidů. Bylo zjištěno, že při použití dusíkatého hnojiva dochází k vyšší produkci galanthaminu oproti rostlinám, u kterých hnojivo použito nebylo. Také došlo ke zjištění, že nejvyššího množství galanthaminu je dosaženo při použití standardní dávky hnojiva a že zvýšení množství hnojiva nevede k vyšší produkci alkaloidů. Nadměrné používání hnojiv není obecně doporučováno kvůli škodlivému vlivu na životní prostředí [63].

Mimo galanthamin můžeme nalézt v *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton i řadu dalších alkaloidů. Z tohoto kultivaru bylo izolováno přes 20 alkaloidů. Druhým nejvíce zastoupeným alkaloidem po galanthaminu je haemanthamin, následovaný narciklasinem [64].

V *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton se vyskytuje i řada zajímavých minoritních alkaloidů, které jsou v posledních letech předmětem zájmu výzkumu. Postupně byly objeveny nové alkaloidní látky s označením karltonin A-E. Dříve byly nesprávně klasifikované jako belladinový typ, nyní jsou řazeny do typu karltoninového [65]. Tento typ AA obsahuje ve své struktuře belladinovou část v kombinaci s fragmentem lykosininu [35]. Látky vykazují zajímavou biologickou aktivitu, a to zejména karltonin A (obrázek 7) a karltonin B (obrázek 8). U těchto alkaloidů byla prokázána významná inhibiční aktivita vůči BuChE, přičemž zároveň dochází k upřednostňování BuChE před AChE [66].



Obrázek 7: Karltonin A



Obrázek 8: Karltonin B

Tyto alkaloidy jsou bohužel v rostlinném materiálu přítomny pouze ve stopovém množství a je velmi obtížné je izolovat pro podrobnější biologický výzkum, či pro komerční využití [66]. Z tohoto důvodu se další výzkum mimo jiné zabývá přípravou syntetických derivátů odvozených od těchto alkaloidů. Byl zachován farmakofor – konkrétně 4-[2-(benzylamino)ethyl]fenol, který je pravděpodobně zodpovědný za biologickou aktivitu. Pomocí *in silico* simulace byl objasněn způsob vazby těchto sloučenin na aktivní místo BuChE. Pro nejslibnější deriváty byly provedeny další testy, které jsou esenciální pro klinické užití. Pomocí BBB skóre byla stanovena schopnost látek pronikat přes hematoencefalickou bariéru a jejich dostupnost v CNS. Dále byla testována rozpustnost ve vodě, mikrozomální a plazmatická stabilita. Rovněž bylo potvrzeno, že látky splňují Lipinského i Veberova pravidla, což poukazuje na jejich potenciál pro absorpci v GIT a možnost perorálního podání. V neposlední řadě byla testována bezpečnost, a to prostřednictvím testování cytotoxicity na buněčných liniích lidského neuroblastomu (SH-SY5Y) a hepatocelulárního karcinomu (HepG2) [67].

Další alkaloidy izolované z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton patří do skupiny galanthaminu, narciklasinu, haemanthaminu, galanthindolu, lykorinu a homolykorinu [40].

3.4 Alzheimerova choroba

AD je multifaktoriální, neurodegenerativní onemocnění, které je provázeno úbytkem neuronů, a to především v mozkové kůře a hipokampu [68], [69]. Choroba má progresivní charakter a u pacientů dochází k postupnému rozvíjení kognitivního deficitu, který se

v pokročilých stádiích onemocnění stává invalidizujícím [70]. Nemoc negativně ovlivňuje kvalitu života nejen pacienta, ale také blízkých osob [71].

AD dostala název po německém psychiatrovi Aloisi Alzheimerovi, který popsal v roce 1906 případ pacientky Auguste Deterové. Tato žena zemřela ve věku 55 let na duševní onemocnění, které zahrnovalo ztrátu paměti a nepředvídatelné chování. Následně byla při pitvě zaznamenána abnormální mozková tkáň [72], [73].

V mozku pacientů s AD se objevují abnormální proteinová depozita jako jsou senilní plaky tvořené beta amyloidem ($A\beta$) či neurofibrilární klubka vznikající z hyperfosforylovaného τ -proteinu. Tyto abnormality vedou k aktivaci neurotoxických kaskád, které vedou k narušení synaptické funkce a apoptóze neuronů [68], [70].

Ztráta neuronálních funkcí a rozvíjející se atrofie je hlavní příčinou neurodegenerativních poruch a tento stav se souhrnně označuje jako demence. Demence řadíme mezi organické duševní nemoci a je u nich charakteristický pokles kognitivních funkcí [72], [74]. Nejčastější příčinou demence bývá AD. Mezi další příčiny demence patří například vaskulární demence, smíšené demence, Parkinsonova nemoc či vzácné případy jako Huntingtonova nemoc, Creutzfeld-Jacobova nemoc či Pickova choroba [75].

Incidence této nemoci stoupá exponenciálně s věkem [72]. Dle epidemiologických průzkumů trpí AD 7-10 % osob starších 65 let a 50-60 % osob starších 85 let [70]. Celosvětově se odhaduje, že počet nemocných s touto chorobou přesahuje 55 milionů [76]. Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná délka života se stále prodlužuje, předpokládá se, že v roce 2050 vzroste počet pacientů na 139 milionů [35], [76]. V roce 2019 tvořili lidé ve věku 55 let a více přibližně jednu třetinu (33,6 %) z celkové populace Evropské unie. Podíl této věkové skupiny v populaci Evropské unie by měl dle odhadů do roku 2050 dosáhnout 40,6 % [77]. V souvislosti s celosvětovým stárnutím populace se stává AD závažným problémem, který je často označován jako tichá epidemie [71]. Statistiky rovněž ukazují, že počet úmrtí na AD roste, zatímco ostatní onemocnění, která sužují lidstvo, jako například kardiovaskulární choroby, rakovina či HIV mají díky lepším možnostem diagnostiky a léčby klesající úmrtnost [74].

Mezi rizikové faktory rozvoje AD patří zejména vysoký věk. Dále sem můžeme zařadit ženské pohlaví či přítomnost apolipoproteinu E4 (apoE4). U lidí bez alel pro apoE4 je riziko vzniku AD 9 %, u heterozygotů 29 % a u homozygotů 83 % [72]. Byly identifikovány i další

faktory, u kterých je podezření že mají vliv na AD, a to například diabetes, dyslipidemie, nízká mentální aktivita, užívání alkoholu, kardiovaskulární onemocnění či nízké dosažené vzdělání [69], [78].

Předpokládá se, že typické změny v mozku jsou přítomny již 20 let před projevením prvních příznaků [79]. Pro AD je typický nenápadný a plíživý začátek. Časté první příznaky jsou potíže se zapamatováním nedávných rozhovorů, jmen nebo událostí, apatie a deprese. Dále se mohou objevit problémy s komunikací, zmatenost, změny chování, poruchy orientace v prostoru a čase [79], [80]. V dřívějších stádiích je postižena paměť týkající se spíše nedávných událostí. Později dochází také k poruchám sémantické paměti. Sémantická paměť zahrnuje získané vědomosti a znalosti [71]. AD je progresivní onemocnění a průběh onemocnění se stále zhoršuje. V pozdějších stádiích se vyskytují potíže s chůzí, mluvením a polykáním. AD končí smrtí, která nastává od prvních příznaků v průměru po 7-10 letech. U některých pacientů dosahovala doba přežití až 20 let [79], [80].

Ve většině případů se AD vyskytuje u osob starších 65 let. Menšinu případů (5-10 %) tvoří skupina výrazně mladších pacientů. Tento typ AD se označuje jako časná či presenilní AD a může se vyskytnout již okolo 30. roku života. Časná forma AD má silnou genetickou determinanci a je spojená především se třemi geny a to APP, PSEN1 a PSEN2 [69].

Patofyziologie zahrnuje mnoho vzájemně propojených mechanismů, které jsou charakterizovány složitou souhrou genetických, enviromentálních a molekulárních faktorů, jež vedou k neurodegeneraci. Pro objasnění základních procesů bylo vysloveno několik klíčových hypotéz, mezi nimiž vyniká cholinergní hypotéza, hypotéza hyperfosforylovaného τ -proteinu a $A\beta$. Mezi další hypotézy patří například mitochondriální teorie, teorie oxidativního stresu či teorie neurozánětu [81].

3.4.1 Amyloidní hypotéza

Jednou z teorií vzniku AD je amyloidní hypotéza. U pacientů dochází k tvorbě tzv. senilních plaků, které jsou tvořeny $A\beta$ [82]. $A\beta$ vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) [83]. Tento protein je za normálních podmínek štěpen enzymem alfa-sekretasou na krátké a rozpustné řetězce. Funkce těchto řetězců není dostatečně objasněna, ale předpokládá se, že se podílí na tvorbě nových synapsí a mají neuroprotektivní funkci [71], [84]. Při AD je APP z větší části štěpena beta a gama sekretasami a vznikají tak delší řetězce o 40-42

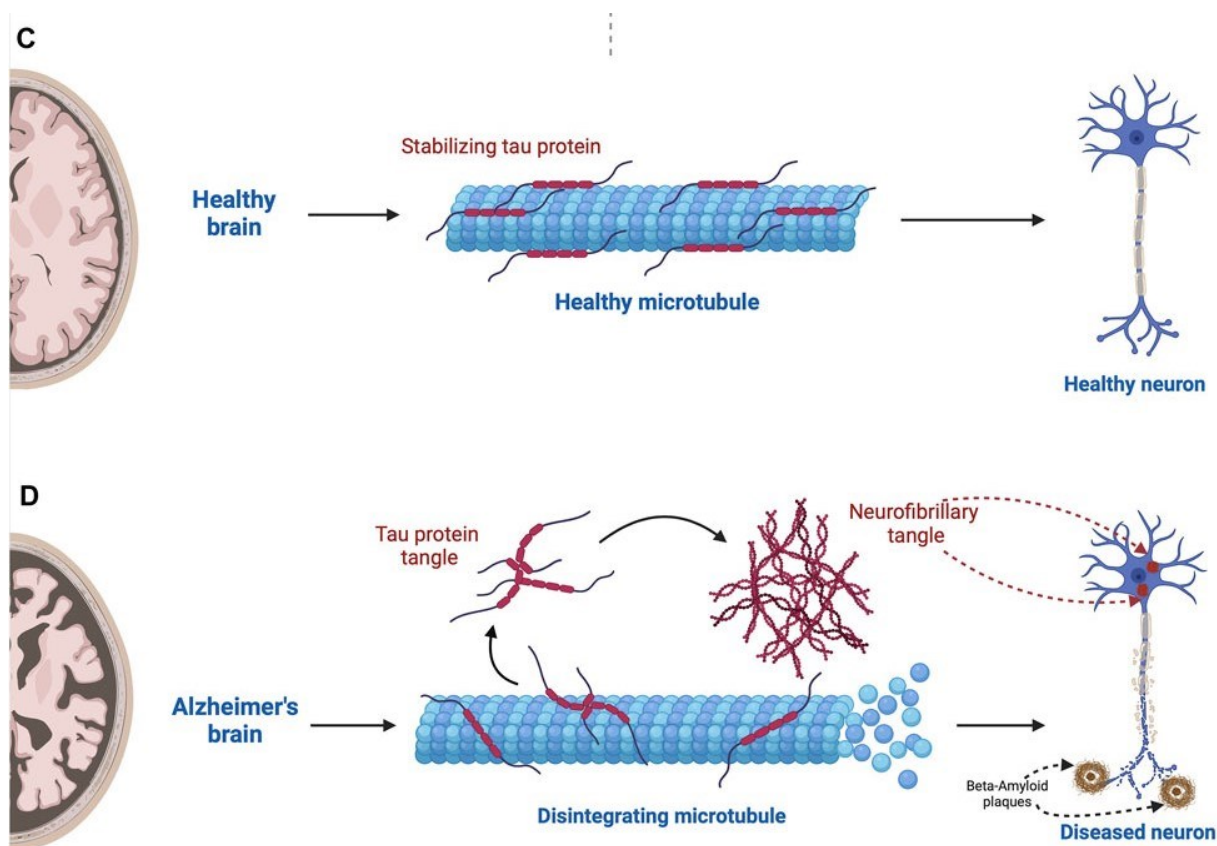
aminokyselinách. Následuje spojení takto dvou vzniklých fragmentů za tvorby vysoce neurotoxických oligomerů [84]. Dále dochází ke koagulaci a polymeraci v extracelulárním prostoru, čímž vznikají již zmiňované A β plaky [71]. A β bývá obvykle odstraňován mikroglie, které mají fagocytující schopnost. U starších lidí je schopnost fagocytózy snížena, což se podílí na hromadění A β [69]. V oblasti plaků vzniká sterilní zánět a dochází k uvolňování mediátorů zánětu. Rovněž dochází k nadměrnému uvolňování excitačních kyselin a aktivaci proteinkinas jako např. GSK-3 β . Poškozené neurony následně podléhají apoptóze [71].

Agregáty A β mimo jiné blokují *N*-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a (*S*)-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové (AMPA) receptory, což se rovněž podílí na poruchách paměti a kognitivní dysfunkci [74].

Dříve byla tato teorie považována za hlavní příčinu AD, ovšem v posledních letech se můžeme setkat se zpochybňujícími názory, které jsou založeny na neúspěchu klinických studií zaměřených na anti-A β monoklonální protilátky. Někteří vědci se přiklánějí k názoru, že primární příčina rozvoje a progresu AD je spíše hypotéza τ -proteinu [69].

3.4.2 Tau hypotéza

V mozku pacientů s AD byly uvnitř neuronů nalezeny tzv. neurofibrilární klubka. Tyto útvary jsou tvořeny hyperfosforylovaným τ -proteinem. Tau protein se fyziologicky podílí na stabilizaci mikrotubulů v neuronech [85]. Při patologických změnách dochází k pozměnění jeho chemické struktury. Krajiní aminokyseliny jsou odštěpovány a zbytek peptidového řetězce je hyperfosforylován [78]. Hyperfosforylace je spouštěna enzymem GSK-3 β za účasti cyklin-dependentní kinasy 5 (CDK5) [86]. Tau protein s pozměněnou chemickou strukturou je uvolňován z mikrotubulů a tvoří párově heliakální filamenta, která se následně shlukují do neurofibrilárních klubek (obrázek 9). Dochází tak k rozpadu a narušení funkce mikrotubulů, které se podílejí na buněčném transportu [87], [88]. Zároveň intracelulární hromadění neurofibrilárních spleť narušuje strukturu neuronu a dochází k apoptóze [78].



Obrázek 9: Zobrazení τ hypotézy [69].

3.4.3 Cholinerní hypotéza

Cholinerní hypotéza, která získala široké uznání, vychází z pozorování, že závažnost AD souvisí s poklesem cholinerních funkcí v mozkové kůře, hipokampu a dalších oblastech mozku [81]. Uvádí se, že mezi hlavní zdroje cholinerní inervace mozku patří nukleus basalis Meynerti, které při této chorobě často podléhá degeneraci [89]. Bylo zjištěno, že pacienti s AD mají narušenou cholinerní neurotransmisi, což se projevuje změnami v aktivitě cholinacetyltransferasy (CAT), sníženými hladinami ACh a změněnými hladinami nikotinových a muskarinových receptorů v mozku [81].

ACh je neurotransmitter, který ovlivňuje kognitivní funkce, jako například paměť či učení. Je syntetizován v cytoplasmě cholinerních neuronů z cholinu a acetylkoenzymu A za současné katalýzy CAT [90]. ACh je degradován enzymem AChE. Na základě tohoto faktu, byly vyvinuty inhibitory AChE s cílem zvýšit hladiny ACh v mozku [82], [91]. Cholinerní teorie byla rovněž podpořena dokázanými negativními účinky anticholinerních látek na kognitivní funkce, a naopak pozitivními účinky inhibitorů AChE [89]. Předpokládá se, že již zmiňovaný $A\beta$ rovněž

negativně ovlivňuje cholinergní aktivitu a způsobuje snížení vychytávání cholinu a uvolňování ACh [90].

3.4.4 Glutamátergní hypotéza

Glutamátergní neurotransmise je zprostředkována pomocí ionotropních glutamátových receptorů, kam řadíme AMPA, kainátové a NMDA receptory. Aktivace synaptických NMDA receptorů se pojí s neuroprotektivními funkcemi, iniciuje plasticitu a podporuje přežívání neuronů. Naopak, aktivace extrasynaptických NMDA receptorů vede k excitotoxicitě [92], [93].

Tato teorie předpokládá, že k úbytku neuronů dochází vlivem nadměrného uvolňování a sníženého zpětného vychytávání excitačních neurotransmiterů, především glutamátu. To způsobuje nadměrnou stimulaci NMDA receptorů a následný zvýšený influx vápníku do buňky. Spouští se tak kaskáda dějů, která vede až k apoptóze neuronu [68], [86].

3.4.5 Mitochondriální hypotéza

Mitochondriální hypotéza AD vychází z významné úlohy mitochondrií v buněčných procesech, včetně procesů souvisejících s neuroplasticitou a neurodegenerací mozku. Tato hypotéza je výrazně podpořena tím, že věk je hlavním rizikovým faktorem AD a mitochondriální dysfunkce je typickým projevem stárnutí [68]. Poškozené mitochondrie mají sníženou produkci ATP, a naopak více produkují ROS, což představuje významný zdroj oxidační nerovnováhy. Dysfunkční mitochondrie rovněž hrají roli v apoptických drahách a přispívají k porušení homeostázy vápníku. [94].

3.4.6 Hypotéza oxidačního stresu

Dle této teorie přispívá k rozvoji AD oxidační stres, přičemž dochází k poškození neuronů působením ROS. Ty mohou být prospěšné v různých signalizačních drahách, ale zároveň mohou poškozovat buněčné struktury, a to například buněčné membrány, lipidy, proteiny či nukleové kyseliny [81]. Mozek je velmi náchylný k oxidačnímu stresu kvůli vysokým energetickým nárokům, vysoké spotřebě kyslíku a velkému množství snadno peroxidovatelných polynenasycených mastných kyselin [94]. ROS vyvolávají zánětlivou reakci, zatímco zánět sám indukuje oxidační stres. Ke zvýšené produkci oxidačního stresu přispívají i A β a fosforylovaný τ -protein. Mimo jiné může oxidační stres přispívat i k narušení mitochondriálních funkcí [68], [94].

3.4.7 Hypotéza neurozánětu

Tato hypotéza naznačuje, že chronický zánět v mozku přispívá k Alzheimerově chorobě tím, že poškozuje synapse a neurony a podílí se tak na narušení kognitivních funkcí. Dlouhodobý zánět způsobuje oxidační stres a neurodegeneraci. Produkce zánětlivých působků může být mimo jiné aktivována A β a fosforylovaným τ -proteinem. Zánět je rovněž spojen s mitochondriální dysfunkcí nebo zvýšenou fosforylací τ -proteinu enzymy, jako jsou CDK5 a GSK-3 β [68].

3.4.8 Inzulinová teorie

Mnoho studií naznačuje, že důležitou roli v patogenezi AD hraje porucha inzulinové signalizace [95]. Normální metabolismus glukózy v mozku je klíčový pro zachování kognitivních funkcí [96]. Inzulinové receptory a inzulinová signalizace ovlivňují homeostázu glukózy, integritu neuronů a kognici prostřednictvím ovlivnění několika mechanismů, včetně influxu vápníku, tvorby neurotransmiterů a synaptických spojení, apoptózy a neurogeneze. Exprese a fosforylace genu τ jsou regulovány prostřednictvím signálních kaskád inzulinu a inzulinu podobného růstového faktoru [95].

Často se můžeme setkat s pojmem diabetes 3. typu [96]. Tento typ představuje formu diabetu, jež selektivně postihuje mozek a zahrnuje chronický stav inzulinové rezistence a nedostatku inzulinu. Mozková inzulinová rezistence a nedostatek inzulinu přispívají ke kognitivním poruchám [97]. Inzulinová rezistence přispívá k aktivaci GSK-3 β , což zvyšuje fosforylací τ -proteinu [96]. Diabetes mellitus 2. typu a dyslipidemie mohou zároveň působit jako rizikové faktory vzniku AD. Zvýšené riziko vzniku demence u diabetu 2. typu může souviset s chronickou hyperglykémií, oxidačním stresem, zvýšenou produkcí zánětlivých působků či akumulací konečných produktů pokročilé glykace. Na základě studií bylo prokázáno, že antidiabetika jako jsou agonisté receptoru aktivovaného peroxizomovým proliferátorem (PPAR), které fungují na úrovni jádra a aktivují geny a signální mechanismy reagující na inzulin, snižují neurodegeneraci [97].

3.4.9 Role GSK-3

Předpokládá se, že významnou roli v kaskádě dějů podílející se na patofyziologii AD má GSK-3. GSK-3 je prolinem řízená serin/threoninová kinasa, jež se účastní řady buněčných procesů včetně metabolismu glykogenu, genové transkripce, stabilizace mikrotubulů či apoptózy [98]. Existuje ve dvou izoformách a to GSK-3 α a GSK-3 β [99]. Aktivita je modulována

inzulinem a Wnt signalizací, přičemž obě dráhy působí negativně [98]. Původně byla GSK-3 popsána jako klíčový regulátor glykogensyntasy, ale dnes je známo, že fosforyluje širokou škálu substrátů. Podílí se na různých signálních drahách jako například Wnt či Hedgehog signální dráze [99]. Tyto signální dráhy hrají roli při vzniku rakoviny. Signální dráha Wnt reguluje produkci A β [100].

Správná signalizace GSK-3 je důležitá pro vývoj neuronů a řízení mnoha procesů, jako je neurogeneze, neuronální diferenciaci, synaptogeneze a přežití buněk. Deregulace signálních drah a aktivity GSK-3 souvisí s patogenezi neurodegenerativních onemocnění, jako je AD [70]. Současně má značný vliv na hyperfosforylaci τ -proteinu, tvorbu A β , syntézu ACh a apoptózu neuronů, což přispívá k patofyziologii Alzheimerovy choroby. U AD byla prokázána zvýšená aktivita GSK-3 [98].

Díky své široké škále funkcí může aktivita GSK-3 přispívat k různým onemocněním, včetně rakoviny, diabetu a kardiovaskulárních poruch. Předpokládá se, že GSK-3 hraje roli u solidních nádorů, jako je kolorektální karcinom, glioblastom, karcinom pankreatu a vaječnicků či u krevních nádorů [51]. Ukázalo se, že hyperaktivita GSK-3 podporuje buněčnou proliferaci, což vede ke vzniku nádorů. Bylo prokázáno, že inhibice aktivity GSK-3 snižuje buněčnou proliferaci a podporuje apoptózu v nádorových buňkách [100]. Mnoho sloučenin s potenciálem inhibice GSK-3 je vyvíjeno jako nové protinádorové látky a vykazuje slibné výsledky [99].

Bylo zjištěno, že homolog genu GSK-3 β je nezbytný enzym pro dokončení asexuálního cyklu parazita *Plasmodium falciparum*, který je původcem malárie. Vzhledem k nárůstu případů rezistence *P. falciparum* vůči široce používaným antimalarikům by mohla být GSK-3 β slibný cíl vývoje nových antimalaricky působících léčiv [99]. Při zkoumání obsahových látek přírodních produktů, byla zjištěna inhibiční aktivita AA vůči GSK-3 β , jak již bylo naznačeno dříve [51].

3.4.10 Terapie AD

Současné metody léčby AD jsou založeny především na cholinergní a glutamatergní teorii [101]. Mezi schválené léčebné postupy, které jsou považovány za standardní péči pro mnoho pacientů s touto chorobou, patří inhibitory cholinesteras a antagonisté NMDA receptorů [102]. Tyto skupiny léků poskytují pouze symptomatickou léčbu a nezabraňují další progresi onemocnění [82]. U mnoho pacientů se daří zmírnit symptomy, jak už kognitivní či behaviorální a prodloužit mírná stádia onemocnění na úkor pokročilých [103].

Prvním předpokladem pro optimální léčbu AD je správná a včasná diagnóza. Léčba se doporučuje začít co nejdříve. Přístup by měl být komplexní a zahrnovat nejen pacienta, ale i jeho rodinu, popřípadě ošetřující osoby. Nezbytná je i racionální léčba dalších chorob [103].

3.4.10.1 Inhibitory cholinesteras

Jedním z terapeutických přístupů ke zvýšení cholinergní neurotransmise je zvýšení dostupnosti ACh. Inhibitory AChE zvyšují dostupnost ACh tím, že brání jeho rozkladu v synaptické šterbině [101].

Podobně jako AChE může ACh inaktivovat i další cholinesterasa a to BuChE [35]. Oba enzymy patří do rodiny α/β -hydrolas, mají společný katalytický mechanismus, ale liší se substrátovou specifitou [67]. Za fyziologických podmínek dominuje v mozku AChE, přičemž BuChE hraje v regulaci hladin ACh menší roli [70]. V pokročilých stádiích AD dochází ke snížení hladin AChE vlivem vyčerpání cholinergních neuronů. Hladina a aktivita BuChE se zvyšuje a BuChE tak přebírá hlavní odpovědnost za ukončení cholinergní neurotransmise [67].

Pro léčbu AD byly doposud schváleny čtyři inhibitory AChE. Jako první byl schválen takrin, který byl však v roce 2013 stažen z trhu z důvodu hepatotoxicity. Současně používané inhibitory AChE jsou galanthamin, donepezil a rivastigmin [69]. Donepezil a galanthamin jsou selektivní inhibitory AChE, zatímco rivastigmin inhibuje AChE i BuChE. Galanthamin zároveň působí jako pozitivní alosterický modulátor nikotinových receptorů a potencuje tak cholinergní neurotransmisi [69], [101].

Obecně se jedná o bezpečná léčiva. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří především GIT nežádoucí účinky jako je nevolnost, zvracení či průjem. Výskyt nežádoucích účinků lze zmírnit pomalou titrací dávky [101]. Rivastigmin vykazuje výrazně lepší snášenlivost, pokud je aplikován ve formě transdermálních náplastí namísto perorální formy. Inhibitory AChE je třeba podávat s opatrností u pacientů s bradykardií či při současném užívání bradykardizujících léčiv. Léčba se začíná nejnižší možnou dávkou a postupně se titruje na maximální dávku či na dávku, kterou pacient toleruje. Pokud se po 3-6 měsících nezaznamená zlepšení pacientova stavu, doporučuje se přehodnotit stávající terapii [103].

3.4.10.2 NMDA antagonisté

Memantin je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, který má za cíl snížit excitační neurotoxicitu zprostředkovanou glutamátem, aniž by bránil fyziologické aktivaci NMDA

receptorů potřebné pro kognitivní funkce [101], [104]. Bylo zjištěno, že má jen slabou až střední afinitu k NMDA receptorům, což znamená, že nedochází k dlouhodobé blokaci receptorů. Díky tomu se vyhýbá nežádoucím účinkům, jako je narušení procesů učení a paměti. Na rozdíl od toho, antagonisti NMDA receptorů s vysokou afinitou, jako fencyklidin nebo ketamin, vykazují negativní účinky, kvůli kterým je jejich použití u AD nevhodné [69], [82]. Kromě svého antagonistického působení vůči NMDA receptorům, aktivuje memantin protein fosfatázu 2A (PP2A), což vede k inhibici fosforylace τ -proteinu [82], [105].

Memantin se řadí mezi symptomatickou léčbu a je schválen pro terapii středně těžké až těžké formy AD [104]. Často se užívá v kombinaci s donepezilem, což vede k lepším výsledkům při zmírnění symptomů než při použití samotného donepezilu. Mezi nejčastější nežádoucí účinky memantinu patří převážně průjem, zácpa či bolest hlavy [69]. Souhrn vlastností jednotlivých léčiv schválených pro léčbu AD je sumarizován v tabulce 2.

Tabulka 2: Souhrn vlastností schválených léčiv používaných v terapii AD [101].

	Galanthamin	Donepezil	Rivastigmin	Memantin
Indikace	Mírná až středně těžká AD	Mírná až středně těžká AD	Mírná až středně těžká AD	Středně těžká až těžká AD
Mechanismus účinku	Selektivní inhibitor AChE a alosterický modulátor nikotinových receptorů	Selektivní inhibitor AChE	Inhibitor AChE a BuChE	Nekompetitivní antagonist NMDA receptorů
Metabolizace přes CYP450	Ano, CYP2D6 a CYP3A4	Ano, CYP2D6 a CYP3A4	Ne	Ne
Poločas	7-8 h	70 h	1 h	60-100 h
Dávkování	2x denně / 1x denně (kapsle s prodlouženým uvolňováním)	1x denně	2x denně	2x denně (1. týden 1x denně)
Užívání ve vztahu k jídlu	Doporučeno s jídlem	Nezávisle na jídle	S jídlem (kvůli zvýšení biodostupnosti)	Nezávisle na jídle
Počáteční dávka	8 mg/den	5 mg/den	3 mg/den	5 mg/den
Navýšení dávky	Každé 4 týdny až do doporučené nebo tolerované dávky	Po 4-6 týdnech	Každé 2 týdny až do doporučené nebo tolerované dávky	Každý týden až do doporučené nebo tolerované dávky
Doporučená denní dávka	16-24 mg	10 mg	6-12 mg	20 mg

3.4.10.3 Terapie modifikující AD

Od roku 2003 nebylo na trh uvedeno žádné nové léčivo na AD. To se změnilo v roce 2021, kdy FDA schválila nový lék na AD pod názvem Aduhelm, obsahující účinnou látku aducanumab. Jedná se o lidskou monoklonální protilátku, která působí na A β plaky. Udělení licence společnosti Biogen na aducanumab jako „vůbec prvnímu léku modifikujícímu Alzheimerovu chorobu“ bylo mnohými označeno za velký pokrok. Schválení se ovšem pojilo s obsáhlou kontroverzí [106], [107]. FDA schválila toto léčivo pomocí cesty zrychleného schválení, v rámci které FDA schvaluje léky na vážnou nebo život ohrožující nemoc, které mohou poskytnout smysluplný terapeutický přínos oproti stávající léčbě [107]. Klinické studie ovšem ukázaly pochybnosti o účinnosti léčiva. Kvůli absenci důkazů o účinnosti léku 3 poradci FDA po schválení léčiva rezignovali [35].

Na začátku roku 2024 společnost Biogen oznámila přehodnocení priorit zdrojů v oblasti AD a oznámila přerušení vývoje aducanumabu. Bylo uvedeno, že přerušení nesouvisí s důvody jako je bezpečnost nebo účinnost [108], [109].

FDA v roce 2023 schválila přípravek Leqembi, který obsahuje účinnou látkou lecanemab. Leqembi byl schválen zrychlenou cestou a později v roce 2023 byl po potvrzujících studiích, které dokládají jeho klinický přínos, převeden na schválení tradičním způsobem [110], [111]. Lecanemab byl vyvinut k léčbě pacientů s mírnou kognitivní poruchou způsobenou AD a pro léčbu AD v raném stádiu [112]. Jedná se o monoklonální protilátku, která se váže na A β a tím redukuje amyloidní plaky v mozku. Podává se formou infuze jednou za 2 týdny. Kandidáti na léčbu by měli mít amyloidovou patologii prokázanou pozitronovou emisní tomografií nebo testy mozkomíšního moku [113].

U lecanemabu se mohou vyskytnout závažné nežádoucí účinky, které zahrnují abnormality v zobrazování související s amyloidem (ARIA), krvácení do mozku či otok mozku. Riziko krvácení zvyšuje antikoagulační léčba. Rovněž bylo zjištěno, že pacienti, kteří jsou nositeli genu APOE4, zejména homozygoti, jsou vystaveni vyššímu riziku ARIA. Před nasazením lecanemabu se doporučuje genetické vyšetření, aby bylo možné pacienty lépe informovat o riziku spojeném s léčbou [113].

Evropská léková agentura (EMA) doporučila dne 25. 7. 2024 zamítnout registraci přípravku Leqembi. Výbor pro humánní léčivé přípravky EMA, usoudil, že pozorovaný účinek tohoto

přípravku na oddálení poklesu kognitivních funkcí nevyvažuje riziko závažných nežádoucích účinků spojených s tímto léčivým přípravkem. Společnost Eisai, která žádala o povolení, může požádat o přezkoumání stanoviska [112].

3.4.10.4 Další terapeutické přístupy

Mezi další slibné terapeutické přístupy, které jsou podrobněji zkoumány patří inhibitory sekretas či vakcíny proti A β . Sekretasy hrají roli v produkci amyloidového peptidu a omezení tvorby amyloidu inhibicí β -sekretasy se jeví jako slibná terapeutická možnost pro léčbu AD [70], [102].

Výzkum se také ubírá na jiné cíle kromě A β , a to například na τ -protein. Kandidáti na léčiva snižují fosforylaci τ -proteinu inhibicí CDK5 a GSK-3 β . Jelikož je však fosforylace τ -proteinu regulována rovnováhou mezi více kinasami, inhibice jediné kinasy může být pro normalizaci fosforylace τ -proteinu nedostatečná [101].

Dalším potenciálním terapeutickým cílem u AD je prolyl oligopeptidasa (POP). Jedná se o enzym, jež štěpí peptidy s nízkou molekulovou hmotností na karboxylové straně prolinového zbytku. POP se nachází v mnoha lidských tkáních. Nejvyšší aktivita byla identifikována v kosterním svalstvu a v mozku. U pacientů s AD byly zjištěny abnormálně zvýšené hladiny POP. Experimenty *in vivo* na zvířecích modelech prokázaly, že inhibice POP je spojena s neuroprotektivní a kognitivně zlepšující funkcí. Přesný mechanismus účinku na kognitivní funkce pomocí inhibitorů POP zatím není plně vysvětlen [114].

AD je složité onemocnění z hlediska patofyziologie a není zatím dostatek konkrétních důkazů o přesné příčině onemocnění. Toto onemocnění lze považovat za multifaktoriální, a je proto klíčové dosáhnout hlubšího porozumění etiologie nemoci, aby mohla být pozornost zaměřena na nejdůležitější cíle. Důležitá je také včasná diagnostika onemocnění pro maximalizaci přínosu léčby. Například amyloidní plaky a neurofibrilární klubka lze detekovat desítky let před vypuknutím příznaků onemocnění [82].

Nefarmakologické postupy jako zdravá a vyvážená strava, cvičení, kognitivní trénink, sociální aktivity a management cévních a metabolických rizik mohou mít pozitivní přínos pro kognitivní funkce. Toto potvrdila finská studie FINGER, která byla první rozsáhlou randomizovanou studií zkoumající vliv životního stylu na zhoršení kognitivních funkcí. Studie prokázala přínos i u osob s genetickou náchylností k AD [102].

3.5 Protinádorová aktivita

WHO definuje rakovinu jako abnormální, nekontrolovaný růst buněk, který může postihnout téměř jakýkoliv orgán nebo tkáň v těle. Odhaduje se, že v roce 2020 způsobila rakovina smrt 10 milionů lidí na celém světě. Mezi nejčastější příčiny úmrtí na rakovinu patřily rakovina plic, prsu, tlustého střeva a konečníku, prostaty, kůže a žaludku [115].

Přírodní látky hrají zásadní roli při objevování a vývoji nových léků pro léčbu různých onemocnění [116]. V oblasti nádorových onemocnění pochází přibližně polovina schválených protinádorových léčiv na bázi malých molekul buď přímo, nebo nepřímo z přírodních zdrojů [115]. Mezi často používaná protinádorová léčiva v klinické praxi patří látky rostlinného původu jako například kamptotecin, podofylotoxin, resp. jeho deriváty, paklitaxel a vinblastin [12].

Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae vykazují značnou strukturní rozmanitost a biologický potenciál, včetně výrazné protinádorové aktivity vůči různým typům rakoviny [115]. Lykorin byl prvním popsáním alkaloidem této čeledi a zároveň byl prvním alkaloidem z čeledi Amaryllidaceae u něžž byly prokázány antiproliferativní účinky. Selektivně indukuje apoptózu v rakovinných buňkách, s významným potenciálem v chemoterapii leukémie, jak ukázala jeho účinnost proti buněčné linii HL-60 akutní promyelocytární leukémie [12]. Rovněž bylo zjištěno, že lykorin *in vitro* inhibuje proliferaci, migraci a přežívání různých buněčných linií karcinomu prostaty, jako jsou DU145, LNCaP a 22RV1 [117].

Mezi další alkaloidy této čeledi s protinádorovým potenciálem patří haemanthamin, který vykazuje významnou cytotoxicitu *in vitro* proti různým typům nádorových buněčných linií jako například MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF7, CEM, K562, A549, Caco-2, HT-29, A2780, SW1573 a T47-D. Haemanthamin působí indukci apoptózy rakovinných buněk, která je doprovázená aktivací kaspáz 3, 7, 8 a 9 a zástavou buněčného cyklu ve fázi G1 a G2/M [117].

Narciklasin byl intenzivně studován jako protinádorová látka *in vitro* i *in vivo* díky svému selektivnímu a velmi účinnému cytotoxickému působení na nádorové buňky. Bylo prokázáno, že narciklasin působí na 60 S podjednotce ribozomů a inhibuje tak růst buněk blokováním biosyntézy bílkovin [10]. Mimo to bylo zjištěno, že další cíl narciklasinu je translační elongační faktor eEF1A, který ovlivňuje nejen biosyntézu proteinů, ale také regulaci aktinového cytoskeletu. Aktinový cytoskelet se podílí na proliferaci a migraci buněk, včetně procesu metastázování. [10], [116]. Narciklasin vykazuje příznivé terapeutické účinky především

u modelů mozkových nádorů [10]. Nedávné studie odhalily, že tento alkaloid indukuje apoptózu u buněk lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a MDA-MB-231 a karcinomu prostaty PC-3 prostřednictvím receptorů smrti DR4 [31], [117]. Kromě rakoviny se jako další slibná oblast jeví zánětlivá onemocnění, jelikož narciklasin prokázal výrazné antiflogistické vlastnosti jak *in vitro*, tak *in vivo* [10].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule taxonu *Narcissus* cv. Carlton (30 kg) byly dodány firmou Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace rostlinného materiálu byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc a dokladný vzorek byl uložen v herbáriu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod označením *Narcissus* cv. Carlton CUFPH-16130/AL-654. Zpracování rostlinného materiálu, příprava sumárního alkaloidního extraktu a jeho rozdělení na frakce pomocí sloupcové chromatografie bylo provedeno v rámci disertační práce MSc. Abdullaha Al Mamun, Ph.D. [118].

4.2 Materiál a laboratorní vybavení

4.2.1 Rozpouštědla, chemikálie

- Acetonitril p. a. (Penta, Praha) – AcCN
- Amoniak p. a. (Penta, Praha) Praha – NH₃
- Chloroform p. a. (Penta, Praha) – CHCl₃
- Cyklohexan p. a. (Penta, Praha) – CHx
- Diethylamin p. a. (Penta, Praha) – DEA
- Dichlormethan p. a. (Penta, Praha) – CH₂Cl₂
- Ethanol p. a. (Penta, Praha) – EtOH
- Ethylacetát p. a. (Penta, Praha) – EtOAc
- Isopropylalkohol p. a. (Penta, Praha) – IPA
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich) – FA
- Methanol p. a. (Penta, Praha) - MeOH
- Toluén p. a. (Penta, Praha) – To
- Trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich) – TFA
- Voda destilovaná (Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, HK) – H₂O

4.2.2 Detekční činidla

4.2.2.1 Dragendorffovo činidlo

Roztok A, který byl připraven z 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého, 20 g kyseliny vinné, 80 ml vody a roztok B, který byl připraven z 32 g jodidu draselného a 80 ml vody se smísí v objemovém poměru 1:1, čímž vznikne zásobní roztok. Detekční roztok byl připraven smísením 5 ml zásobního roztoku, 10 g kyseliny vinné a 50 ml vody. Detekční i zásobní roztok byly uchovávány v lednici.

4.2.3 Přístrojové vybavení

- Analytická váha KERN ABJ (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germany)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10 P (Bandelin, Berlin, Germany)
- UV lampa CAMAG (Camag, Muttenz, Switzerland)
- Vakuová rotační odparka Buchi Rotavapor R-114 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland)
- GC-MS systém Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Systém pro flash chromatografii puriFlash 535-XL (Interchim, Montluçon, France)
- HPLC systém Waters Autopurification™ HPLC-MS (Waters Corporation, Milford, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)

4.2.4 Databáze použité k vyhodnocení výsledků

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

4.2.5 Chromatografické sorbenty

- Komerční analytické desky pro TLC Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck, Praha) o velikosti 20 × 20 cm
- Komerční desky pro TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄-S (Merck, Praha) o velikosti 20 × 20 cm
- Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck, Praha) pro přípravu litých desek; množství použitého SiO₂ bylo 29 mg/cm².
- Křemelina Celite 535 (Sigma-Aldrich, Praha), velikost částic 0,02-0,1 mm.
- Silica gel 60 pro flash chromatografii, velikost částic 15 μm (Interchim, Chromservis, Praha).

4.2.6 Vytvářecí soustavy pro TLC

Tabulka 3 : Vytvářecí soustavy použité pro TLC

Soustava	Složení	Poměr
S1	To:EtOAc:DEA	15:75:5
S2	CHx:EtOAc:DEA	7:2:1
S3	To:DEA	9:1
S4	EtOAc:AcCN:NH ₃	80:80:0,2
S5	EtOAc:AcCN:NH ₃	80:80:0,2
S6	To:DEA	9:1
S7	CHx:EtOAc:DEA	7:2:1
S8	EtOAc:AcCN:NH ₃	40:40:0,1
S9	AcCN:MeOH:TFA	40:10:0,1
S10	EtOAc:DEA	9:1
S11	AcCN:MeOH:TFA	40: 10: 0,1
S12	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	19:1
S13	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	1:1
S14	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	9:1
S15	EtOAc:AcCN:NH ₃	40:40:0,1
S16	CHx:EtOAc:DEA	30:70:5
S17	IPA:H ₂ O:TFA	80:20:0,1
S18	CHCl ₃ :MeOH:TFA	45:5:0,1

4.2.7 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, Praha)
- Čištěná vata
- Sušící perly silikagelu (Penta, Praha)

4.3 Obecné postupy

4.3.1 Rozpouštění vzorku

Vzorek byl před nanesením na TLC desky rozpuštěn v malém množství rozpouštědla. Jako rozpouštědlo bylo použito CHCl₃:EtOH v poměru 1:1, popřípadě CH₂Cl₂:MeOH rovněž v poměru 1:1.

4.3.2 Analytické TLC

Na komerční TLC desku byl narýsován start, který ležel 1 cm od spodní hrany desky a 1 cm od bočních hran desky. Na start byl pomocí kapiláry nanesen roztok analyzované látky. TLC deska byla vložena do předem nasycené komory. Skleněná komora byla sycena parami příslušení mobilní fáze, která byla nalita do komory v takovém množství, aby vložená deska byla ponořena alespoň 0,5 cm v mobilní fázi. Složky analyzovaného vzorku byly unášeny mobilní fází a v závislosti na odlišné afinitě vůči stacionární a mobilní fázi byly jednotlivé složky směsi separovány. TLC deska byla z komory vyjmuta v momentě, kdy mobilní fáze dosáhla čela, které se nachází cca 0,5 cm pod horním okrajem desky.

4.3.3 Detekce alkaloidů

TLC deska byla po vyjmutí z komory vysušena. Po vysušení byla deska pozorována pod UV lampou s vlnovou délkou 254 nm, popřípadě 366 nm. TLC deska pod UV lampou fluoreskovala a stanovované látky byly viditelné jako tmavé skvrny, které fluorescenci zhášejí. Skvrny byly označeny tužkou. Dále byla detekce prováděna pomocí Dragendorffova činidla. Desky se zakroužkovanými skvrnami byly postříkány činidlem, které reagovalo s přítomnými alkaloidy za vzniku oranžového zbarvení.

4.3.4 Příprava preparativních litých desek

Skleněná deska o rozměru 15x15 cm byla očištěna pomocí ethanolu. V kádince bylo smíseno 6,5 g silikagelu s 22 ml H₂O. Vzniklá suspenze byla nalita doprostřed skleněné desky a pomocí tyčinky byla rovnoměrně rozprostřena po celé ploše desky. Po nalití se desky nechaly nejméně 24 hodin zaschnout při pokojové teplotě.

4.3.5 Preparativní TLC

Na desce byl vyznačen start vzdálený 1,5 cm od spodní hrany desky a 1 cm od bočních hran desky. Počet použitých desek vycházel z množství látky, které bylo na desku nanášeno. Pomocí preparativního pera byl na start nanesen roztok vzorku ve formě jednolitě čáry. Deska byla vložena do předem nasycených komor. Komory byly syceny vhodně zvolenou mobilní fází, která byla zvolena na základě předem provedeného analytického TLC. Poté co mobilní fáze dosáhla čela, které je cca 0,5 cm pod horním okrajem desky, byla deska vyjmuta z komory. Po vysušení desky následovala detekce jednotlivých oddělených zón pod UV lampou. Jednotlivé zóny byly na základě stejného retenčního faktoru vyškrabány a následně eluovány.

4.3.6 Eluce

Vyškrabaný sorbent byl smíchán s křemelinou v poměru 1:1 a vsypán do skleněné kolony, která byla naplněna kouskem přečištěné vaty a lžící křemeliny. Následovala eluce směsí MeOH s EtOAc v poměru 1:1. Eluát byl jímán do baňky a po ukončení eluce odpařen na vakuové odparce a vysušen v exsikátoru. Následně byl odpařený vzorek skladován v lednici při teplotě 2-8 °C.

4.3.7 GC-MS analýza

Separované alkaloidy byly analyzovány pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Byla použita kolona Hp-5MS s rozměry 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. (Agilent Technologies, USA). Teplotní program byl zvolen následující: 100 °C–180 °C (25 min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min. Nástřik 1 μl methanolického roztoku vzorku s koncentrací 1 mg/ml byl proveden při splitu 1:10 a při teplotě 280 °C. Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány porovnáním získaných spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty publikovanými v literatuře a se standardy látek dříve izolovanými na pracovišti.

4.3.8 LC-MS analýza

Vzorky o hmotnosti 0,2–0,3 mg byly rozpuštěny v 1 ml MeOH čistoty LC-MS a analyzovány pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Přístroj zahrnuje moduly Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientovou pumpu Waters 2545, detektor s diodovým polem Waters 2998 a hmotnostní spektrometr Waters Acquity qDa. Analýza probíhala při laboratorní teplotě. Pro separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm, 5 μm) (Milford, USA). Mobilní fáze tvořily voda s 0,1 % kyseliny mravenčí (rozpuštědlo A) a MeOH s 0,1 % kyseliny mravenčí (rozpuštědlo B) s průtokem 0,8 ml/min. Gradientový eluční program byl nastaven následovně (v/v): 0 min 5 % B, 5 min 100 % B, 8,5 min 5 % B, s následnou 2,5minutovou ekvilibrací na počáteční podmínky. Optimální parametry ESI-MS byly: kapilární napětí 0,8 kV, teplota sondy 600 °C a kuželové napětí 15 V. Hmotnostní spektra LC/MS byla získávána v rozmezí 200–800 m/z. Pro detekci pomocí PDA byl detektor nastaven na rozsah 190–700 nm. LC ESI-MS analýzy probíhaly v pozitivním iontovém režimu. Eluce sloučenin probíhala v pořadí od více polárních k méně

polárním složkám, s rostoucí eluční silou mobilní fáze, přičemž koncentrace kyseliny mravenčí zůstávala konstantní.

4.3.9 Preparativní LC-MS analýza

Vzorky o objemu 1000 μ l (6-8 mg) byly rozpuštěny v 1,5 ml MeOH čistoty LC-MS a separovány pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Tento systém zahrnuje moduly Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientovou pumpu Waters 2545, detektor s diodovým polem Waters 2998 a hmotnostní spektrometr Waters Acquity qDa. Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Pro separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 19 mm, 5 μ m) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byla použita voda s 0,1 % kyseliny mravenčí (rozpuštědlo A) a MeOH s 0,1 % kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B) s průtokem 20 ml/min. Gradientový eluční program byl nastaven následovně (v/v): 0 min 5 % B, 9 min 100 % B, 11,5 min 5 % B, následně 0,5 minuty ekvilibrace v počátečních podmínkách. Optimální parametry ESI-MS byly: kapilární napětí 0,8 kV, teplota sondy 600 °C, kuželové napětí 15 V. Hmotnostní spektra LC/MS byla zaznamenána v rozmezí 200-800 m/z. Pro detekci pomocí PDA byl rozsah detektoru nastaven na 190–700 nm. LC ESI-MS analýzy byly prováděny v pozitivním iontovém režimu. Eluce sloučenin probíhala postupně od více polárních k méně polárním složkám s rostoucí eluční silou mobilní fáze, přičemž koncentrace kyseliny mravenčí zůstávala po celou dobu konstantní.

4.3.10 Optická otáčivost

Optická otáčivost izolovaných alkaloidů byla stanovena pomocí polarimetru P3000. Vzorky byly rozpuštěny v CHCl_3 a následně změřeny při laboratorní teplotě. Specifická otáčivost byla vypočítána dle následujícího vzorce:

$$\alpha_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

α – naměřená optická otáčivost [°]

t – teplota měření [°C]

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

c – koncentrace látky [g/100 ml]

l – délka kyvety [dm]

4.4 Stanovení biologické aktivity izolovaných alkaloidů

4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám

Pro stanovení aktivity byly použity rekombinantní enzymy připravené na Katedře chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Hradec Králové. Je používáno médium obsahující enzymy, které je v čas potřeby naředěno 100mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak aby hodnota absorbance byla pro AChE v rozmezí 0,08 – 0,15 a pro BuChE 0,15 – 0,20. Toto médium je zamraženo a uchováváno v při teplotě při -22 °C do doby použití.

Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů:

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda, s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [$\lambda = 436$ nm pro AChE nebo $\lambda = 412$ nm pro BuChE]. Při měření byl sledován nárůst absorbance během jedné minuty. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z dat o poklesu aktivity AChE nebo BuChE pomocí nelineární regrese v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly srovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras, jako jsou galanthamin a huperzin A. Procenta inhibice (% I) byla vypočítána podle následujícího vzorce:

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

% I – procento inhibice

ΔA_{bl} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min

ΔA_{sa} = absorbance testovaného vzorku během 1 min

Stanovení aktivity enzymů:

Do šesti jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, následně přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Směs byla promíchávána na mikrotřepačce po dobu 1 minuty a poté inkubována v readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM ATChI nebo 10 mM BuTChI) a absorbance byla měřena při příslušné vlnové délce (436 nm pro AChE-hemolyzát a 412 nm pro BuChE-plazmu). Poté byl vypočítán rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou podle výše popsané metody.

Stanovení aktivity látek:

Stanovení aktivity látek se provádí na mikrotitrační destičce, kde se používají stejné objemy činidel a substrátového roztoku a stejný postup měření jako u stanovení enzymové aktivity. Rozdíl je v tom, že místo 8,3 μ l DMSO se pipetuje roztok testované látky v příslušné koncentraci. Pro každou látku se použije 6 jamek (1 řada), přičemž do poslední řady se přidává DMSO jako slepý vzorek. Nejprve se provádí screeningové měření, kdy se všechny látky měří při koncentraci 4 mM (jedná se o koncentraci, na kterou se ředí vzorek před pipetováním do jamky) respektive 100 μ M (koncentrace vzorku při měření, která se snížila po naředění činidly pro měření aktivity). U látek, které při této koncentraci vykazují inhibiční potenciál vyšší než 50 %, je následně stanovena hodnota IC_{50} . Získané hodnoty IC_{50} pro inhibici AChE a BuChE u jednotlivých látek byly porovnány s inhibičními aktivitami referenčních látek.

4.4.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči POP

POP byla rozpuštěna v pufovaném fyziologickém roztoku PBS, přičemž specifická aktivita enzymu byla 0,2 U/ml. Inhibiční aktivita byla testována v polystyrenové mikrotitrační destičce s plochým průhledným dnem. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO, čímž byly připraveny zásobní roztoky s koncentrací 10 mM. Roztoky pro testování (v rozmezí 10^{-3} – 10^{-7} M) byly připraveny ředěním těchto zásobních roztoků superčistou vodou, přičemž slepé vzorky obsahovaly DMSO ve stejné koncentraci jako testované vzorky. Jako substrát pro měření inhibiční aktivity byl použit Z-Gly-Pro-p-nitroanilid rozpuštěný v 40 % 1,4-dioxanu s koncentrací 10 mM.

V každé jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 170 μ l PBS, 5 μ l roztoku testované látky o určité koncentraci a 5 μ l roztoku POP. Směs byla inkubována po dobu 5 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 20 μ l substrátu, a směs byla dále inkubována 30 minut při 37 °C. Vznik p-nitroanilinu, který je přímo úměrný aktivitě POP, byl následně sledován a měřen spektrofotometricky při 405 nm pomocí ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC_{50} . Výsledné inhibiční aktivity byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek, konkrétně berberinu ($IC_{50} = 142,3 \pm 21,1$ mM) a Z-Pro-prolinalu ($IC_{50} = 3,269 \pm 0,021$ mM).

4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β

Inhibice GSK-3 β byla studována luminiscenční metodou dle Bakiho et al. s využitím Kinase-Glo Kitu (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Španělsko). Měření probíhalo v bílých

96-jamkových destičkách s plochým dnem. Do každé jamky bylo přidáno 10 μ l roztoku testované látky v DMSO o koncentraci 1 mM, naředěného pufrem (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA a 15 mM octanu hořečnatého) na požadovanou koncentraci. Poté bylo přidáno 10 μ l ATP (konečná koncentrace 1 μ M), 10 μ l 100 μ M GSM a 10 μ l GSK-3 β (20 ng). Negativní kontrola obsahovala dalších 10 μ l pufru, zatímco do pozitivní kontroly bylo přidáno 10 μ l standardu SB-415286. Celková koncentrace DMSO nepřekročila 5 %. Reakční směs byla inkubována 30 minut při 37 °C, poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 40 μ l Kinase-Glo činidla a po dalších 10 minutách byla měřena luminiscence. Podrobnější popis metody lze najít v publikaci Hulcová et al. (2018) [51].

4.4.4 Stanovení cytotoxicity

Ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Hradci Králové byla provedena analýza buněčné viability a cytotoxického účinku testovaných látek pomocí kolorimetrické metody WST-1. Tato metoda je upravenou verzí MTT metody, avšak místo použití 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu, jak je tomu u MTT, využívá 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát. Obě činidla jsou tetrazoliové soli, avšak WST-1 test nevyžaduje krok rozpouštění, což jej činí rychlejším a citlivějším.

Z testovaných látek byly podle jejich rozpustnosti připraveny zásobní roztoky v koncentracích 10 až 50 mM, které byly následně naředěny tak, aby koncentrace DMSO byla nižší než 0,1 %, čímž se eliminoval jeho potenciální toxický vliv. Buňky byly nasazeny do 96-jamkové destičky s plochým dnem v koncentraci 1000 buněk na jamku. Po 24hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % koncentraci CO₂ byly do jamek přidány testované látky v koncentraci 10 μ M, případně doxorubicin v koncentraci 1 μ M jako pozitivní kontrola. Po 48 hodinách inkubace za stejných podmínek bylo do jamek přidáno činidlo WST-1, které bylo v živých buňkách redukováno mitochondriálními dehydrogenasami na purpurový formazan. Tento formazan byl rozpuštěn přidáním DMSO. Absorbance byla měřena na přístroji Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko).

Absorbance byla měřena při vlnové délce 440 nm, přičemž intenzita zbarvení roztoku byla přímo úměrná množství živých buněk. Aktivita každé testované látky byla stanovena na základě tří nezávislých experimentů, přičemž byla vypočítána buněčná viabilita ve srovnání s negativní kontrolou, kde k buňkám nebyla přidána žádná účinná látka, pouze 0,1 % DMSO, což odpovídá

jeho koncentraci v ostatních jamkách. U aktivních látek je stanovena hodnota IC_{50} , a to pomocí softwaru GraphPad Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.5 Izolace alkaloidů

4.5.1 Frakce Ft

Experimentální část započala zpracováním frakce Ft se snahou izolovat alkaloidní látky v čistém stavu. Počáteční frakce Ft vážila 173 mg. Frakce byla rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$: EtOH 1:1 a byla podrobena prvnímu dělení na 6 preparativních TLC deskách za použití S1. Desky byly vyvíjeny celkem třikrát. Výsledkem prvního dělení bylo 5 oddělených zón. Jednotlivé zóny byly vyškrábány, spojeny dle retenčního faktoru, zeluovány pomocí eluční směsi $CHCl_3$: EtOH 1:1 do vytárovaných baněk a odpařeny pomocí vakuové odparky. Nadále byly dosušeny v exsikátoru a skladovány v lednici. Vznikly tak nové podfrakce s následujícím označením a navázkou.

Tabulka 4: Označení a navážka vzniklých podfrakcí po prvním dělení

Označení podfrakce	Navážka
Ft-1	5,5 mg
Ft-2	20,5 mg
Ft-3	19,5 mg
Ft-4	18,9 mg
Ft-5	30,5 mg

Podfrakce Ft-2, Ft-3, Ft-4 a Ft-5 byly dále přečišťovány pomocí preparativní TLC. Jednotlivé použité MF a vzniklé podfrakce po dělení jsou zobrazeny v tabulce 5. Po nalezení vhodné mobilní fáze, kdy se látky při analytickém TLC od sebe ideálně oddělily, bylo provedeno preparativní TLC. Vzniklé zóny byly vždy vyškrábány a na základě stejného retenčního faktoru spojeny. Následovala eluce jednotlivých spojených zón pomocí eluční směsi $CHCl_3$: EtOH 1:1 a následné odpaření pomocí vakuové odparky. Jednotlivé podfrakce byly dále analyzovány pomocí GC-MS chromatografie.

Tabulka 5: Vzniklé podfrakce po dalším preparativním TLC

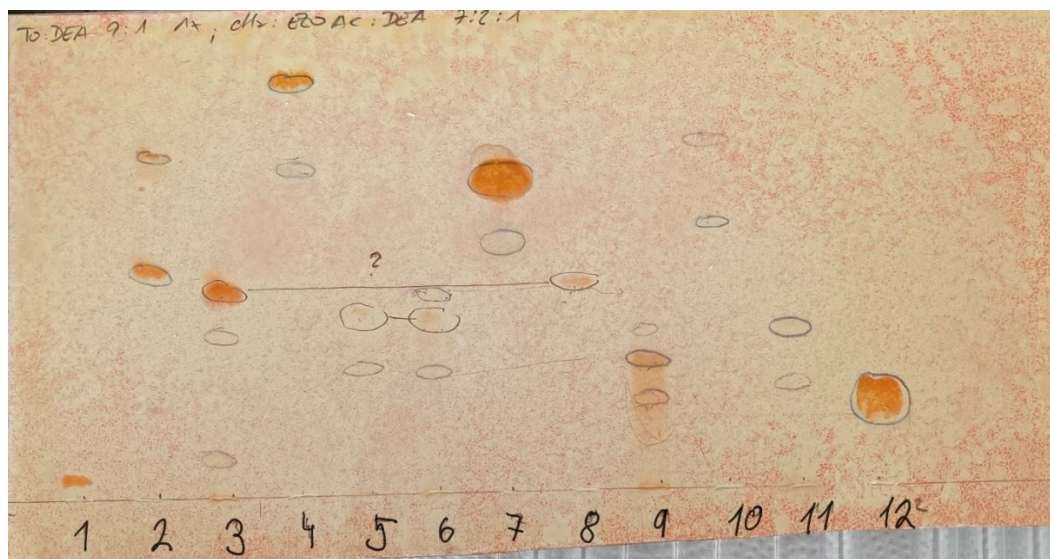
Původní podfrakce	Vzniklé podfrakce	Použitá mobilní fáze
Ft-2	Ft-2-1, Ft-2-2	S2
Ft-3	Ft-3-1, Ft-3-2, Ft-3-3	S3
Ft-4	Ft-4-1, Ft-4-2, Ft-4-3, Ft-4-4	S4
Ft-5	Ft-5-1, Ft-5-2, Ft-5-3, Ft-5-4	S5

Následovalo porovnávání podfrakcí Ft-3-1, Ft-3-2, Ft-3-3 a Ft-5-2, Ft-5-3, Ft-5-4 se standardy vybraných alkaloidů, přičemž jako standardy byly použity AA homolykorinového strukturního typu, které byly na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky izolovány dříve a byly dostupné v dostatečném množství. Soupis použitých AA je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6: Přehled použitých standardů

9-O-demethylhomolykorin
Lykorenin
Odulin
Tetrahydromasonin
Masonin
Homolykorin
Demethylmasonin
Eugenin
Hippeastrin

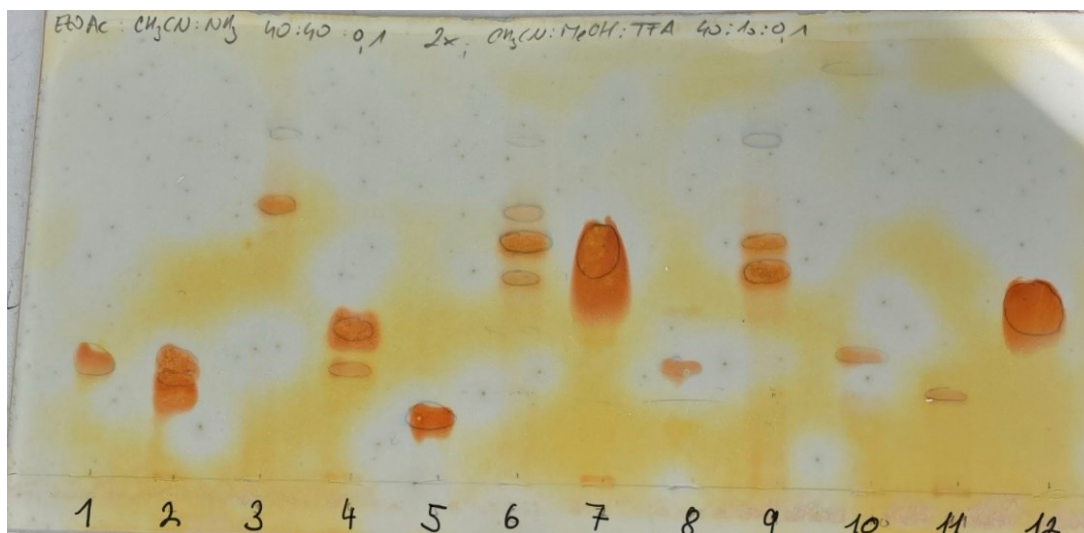
Porovnávání podfrakcí se standardy probíhalo na 2 TLC deskách. Na první desku (obrázek 10) byla nanesena společně se standardy podfrakce Ft-3-1, Ft-3-2, Ft-3-3 a jako mobilní fáze byla použita nejprve S6 a poté S7. Na druhou desku (obrázek 11) byly naneseny spolu se standardy podfrakce Ft-5-2, Ft-5-3, Ft-5-4 za použití mobilní fáze S8 a poté S9. V následujících tabulkách je znázorněno pořadí, v kterém byly standardy a vzorky naneseny na TLC desky.



Obrázek 10: Porovnávací TLC deska č. 1 – porovnání podfrakce Ft-3-1, Ft-3-2, Ft-3-3 se standardy

Tabulka 7: Pořadí nanesených látek na porovnávací TLC desku č.1

Pořadí	Látka
1.	9-O-Demethylhomolykorin
2.	Lycorenin
3.	Ft-3-1
4.	Odulin
5.	Tetrahydromasonin
6.	Ft-3-2
7.	Masonin
8.	Homolykorin
9.	Ft-3-3
10.	Demethylmasonin
11.	Eugenin
12.	Hippeastrin



Obrázek 11: Porovnávací TLC deska č. 2 - porovnání podfrakce Ft-5-2, Ft-5-3, Ft-5-4 se standardy

Tabulka 8: Pořadí nanesených látek na porovnávací TLC desku č. 2

Pořadí	Látka
1.	9-O-Demethylhomolykorin
2.	Lycorenin
3.	Ft-5-2
4.	Odulin
5.	Tetrahydromasonin
6.	Ft-5-3
7.	Masonin
8.	Homolykorin
9.	Ft-5-4
10.	Demethylmasonin
11.	Eugenin
12.	Hippeastrin

Následovalo hledání mobilní fáze pro další přečištění podfrakce Ft-5-3 a Ft-5-4. Bylo provedeno preparativní TLC za použití S10 a vzniku podfrakcí Ft-5-3-1, Ft-5-3-2 a Ft-5-4-1, Ft-5-4-2.

Na základě kontrolního analytického TLC byly podfrakce spojeny dohromady. Spojeny byly podfrakce Ft-5-3-1 + Ft-5-4-1 za vzniku frakce, jež byla označena jako Ft-6 a podfrakce Ft-5-3-2 + Ft-5-4-2 za vzniku frakce s označením Ft-7. Z důvodu přítomnosti nečistot (pravděpodobně silikagelu) byly frakce přefiltrovány přes vat. Při zpracovávání frakcí bylo možné pozorovat krystalizaci a při GC-MS analýze byl pozorován vždy pouze jeden pík s neznámou molekulovou

hmotností. Frakce byly proto podrobeny NMR analýze, která ovšem ukázala, že se i přes výsledky TLC a GC-MS analýzy jedná o směs více látek.

Dále byla věnována pozornost podfrakci Ft-5-2, jelikož dle výsledků TLC se látka zdála být téměř čistá. Podfrakce byla ještě přečištěna pomocí preparativní TLC za použití S11. Z důvodu velmi malého množství látky (2,4 mg) a neuspokojivých výsledků NMR analýzy, bylo učiněno rozhodnutí nevěnovat nadále pozornost frakci Ft a zaměřit se na zcela novou frakci.

4.5.2 Frakce Fi, Fj3, Narc/2

Experimentální část dále vycházela ze 3 alkaloidních frakcí označených jako Fi, Fj3 a Narc/2. Na základě jejich velmi výrazné podobnosti zjištěné pomocí GC-MS a HPLC-MS analýzy byly tyto 3 frakce spojeny dohromady. Každá jednotlivá frakce byla rozpuštěna v dostatečném množství rozpouštědla (CH_2Cl_2 a MeOH v poměru 1:1) a byla kvantitativně převedena do jedné baňky. Po odpaření a dosušení v exsikátoru vzniklá spojená frakce vážila 1,265 g.

4.5.2.1 Flash chromatografie spojených frakcí

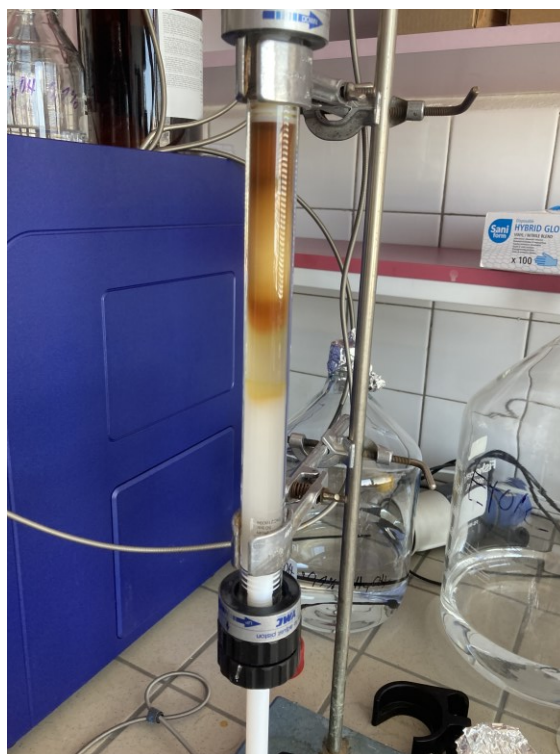
Bylo rozhodnuto, že vzhledem k velikosti nově získané spojené frakce, bude tato frakce rozdělena pomocí flash chromatografie na přístroji puriFlash 535-XL. Následovalo hledání vhodné mobilní fáze pomocí analytického TLC pro ideální separaci alkaloidních látek. Jako nejvhodnější mobilní fáze se jevila S12.

Byl připraven roztěr, kdy došlo k převrstvení 3 g křemeliny roztokem 1,265 g alkaloidního extraktu v dostatečném množství CH_2Cl_2 s malým množstvím MeOH. Vzniklá suspenze byla zahřívána na vodní lázni, dokud nedošlo k úplnému odpaření rozpouštědla a naadsorbování extraktu na částice křemeliny. Takto připravený roztěr byl ponechán přes noc v exsikátoru a poté byl převeden do předkolony. Do kolony bylo naplněno 25 g sférického silikagelu o velikosti částic 15 μm (obrázek 12).

Na eluci látek byl použit CH_2Cl_2 a MeOH s 0,1 % přidaného NH_3 , který napomáhá lepší separaci alkaloidních bazických látek. Byla použita gradientová eluce, jejíž průběh je uveden v tabulce 9. Na závěr byla kolona promyta MeOH s 1 % kyseliny mravenčí.

Tabulka 9: Eluční gradient použitý při flash chromatografii

CH ₂ Cl ₂ (%)	MeOH+0,1 % NH ₃ (%)	Eluční čas (min)
100	0	6
99	1	12
98	2	18
97	3	24
95	5	30
90	10	36
85	15	42
80	20	48
70	30	54
60	40	60
50	50	66
25	75	72
0	100	78



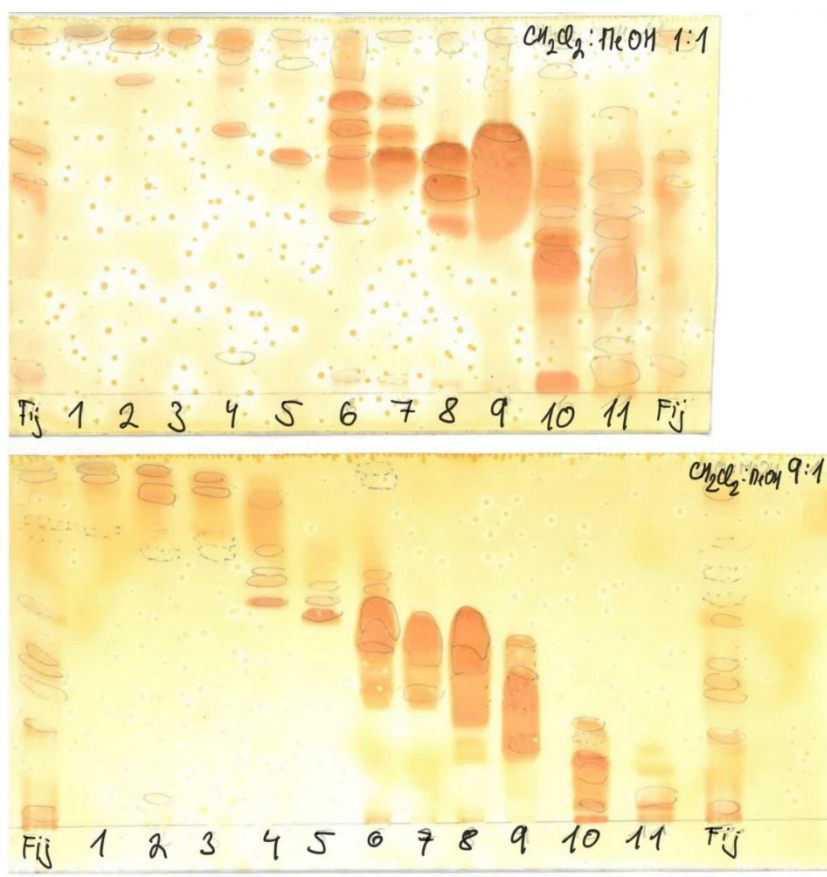
Obrázek 12: Průběh flash chromatografie

Výsledkem flash chromatografie bylo 178 podfrakcí. Po provedení analytického TLC došlo na základě retenčních faktorů ke spojení podfrakcí a vzniku celkově 11 frakcí.

Tabulka 10: Podfrakce a nově vzniklé frakce po flash chromatografii

Spojené podfrakce	Vzniklá frakce	Navážka vzniklé frakce
16-21	F1	11 mg
22-40	F2	20 mg
41-50	F3	17,2 mg
51-64	F4	33,5 mg
65-75	F5	16,3 mg
76-90	F6	120,5 mg
91-103	F7	80,7 mg
104-126	F8	237,4 mg
127-151	F9	467,1 mg
151-178	F10	90,4 mg
konec – MeOH a FA 1 %	F11	54,2 mg

Následně bylo provedeno souhrnné TLC spojených frakcí (obrázek 13) a každá frakce byla odpařena na vakuové odparce.



Obrázek 13: Souhrnné TLC vzniklých frakcích

Při spojování jednotlivých podfrakcí si bylo možné povšimnout, že se na stěnách zkumavek tvořily krystaly (obrázek 14). Tento jev byl nejvíce pozorovatelný u následně vzniklých frakcí F8 a F9. Tyto dvě frakce byly rozpuštěny v CHCl_3 : EtOH 1:1 a byly ponechány krystalizovat.



Obrázek 14: Krystalizace při zpracování podfrakcí.

4.5.2.2 Zpracování frakce 5

Z každé frakce bylo odebráno 0,5 mg na GC-MS a dle výsledku analýzy spekter byla pozornost věnována frakci číslo 5. Tato frakce byla rozpuštěna v malém množství CH_2Cl_2 : MeOH 1:1 a pomocí preparativního pera byla nanesena na komerční TLC desku. Bylo provedeno preparativní TLC, kdy jako mobilní fáze byla použita S13. Výsledkem bylo oddělení 2 zón. Jednotlivé zóny byly vyškrabány a zeluovány a vznikla tak podfrakce F5-1 a F5-2. Podfrakce F5-2 byla převedena do vialky a odevzdána na NMR analýzu. Navážka činila 6,8 mg. Na základě NMR analýzy byla látka identifikována jako homolykorin a označena jako **IZ-1**.

4.5.2.3 Zpracování frakce 7

Frakce 7 byla rozpuštěna v dostatečném množství CH_2Cl_2 : MeOH 1:1 a pomocí preparativního pera byla nanesena na 5 komerční TLC desek a vyvinuta ve směsi S14. Na základě analýzy pod UV světlem a pomocí Dragendorffova činidla byly separovány 3 zóny a byly tudíž získány podfrakce F7-1, F7-2 a F7-3 (tabulka 11), která byla dále zpracovávána. 20,5 mg podfrakce F7-3 bylo přečištěno na 2 komerčních TLC deskách v mobilní soustavě S15. Desky byly vyvinuty celkem 2x a byla extrahována pouze majoritní zóna (14,8 mg), která byla pomocí

GC-MS a NMR analýzy určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu galanthin. Získaná látka získala označení **IZ-2**.

Tabulka 11: Vzniklé podfrakce F7-1, F7- 2, F7-3 a jejich navážky

Podfrakce	Navážka
F7-1	26,4,5 mg
F7-2	8,2 mg
F7-3	20,5 mg

4.5.2.4 Zpracování frakce 8

Frakce F8 byla původně krystalizována, ale jelikož dosažený výsledek nebyl ideální, byla zvolena jiná metoda pro přečištění frakce. Tato frakce byla přečišťována pomocí preparativní TLC na 6 litých deskách. Tomuto procesu předcházelo hledání vhodné mobilní fáze pomocí analytického TLC. Jako nejvíce ideální mobilní fáze se jevila S16. Pomocí preparativního TLC došlo ke vzniku 3 oddělených zón, které byly vyškrabány a následně zeluovány za vzniku podfrakcí F8-1, F8-2 a F8-3. Všechny podfrakce byly odpařeny pomocí vakuové odparky a dosušeny v exsikátoru.

Tabulka 12: Vzniklé podfrakce F8-1, F8- 2, F8-3 a jejich navážky

Podfrakce	Navážka
F8-1	31,5 mg
F8-2	13,7 mg
F8-3	186,9 mg

Při provedení kontrolního analytického TLC (obrázek 15), bylo zjištěno že podfrakce F8-3, která byla majoritní, a tudíž upoutala naši pozornost nejvíce, není zcela čistá a je zapotřebí další přečištění.



Obrázek 15: Kontrolní analytické TLC podfrakce F8-1, F8-2, F8-3. MF: S16

Přečištění bylo provedeno opět pomocí preparativního TLC. Podfrakce F8-3 byla rozpuštěna a pomocí pera nanesa na 10 komerčních desek a vyvíjena v předem nasycených komorách. Jako mobilní fáze byla použita S17. Došlo ke vzniku 2 oddělených zón, které byly vyškrábány a zeluovány za vzniku podfrakcí F8-3-1 a F8-3-2. Podfrakce byly odpařeny pomocí vakuové odparky a dosušeny v exsikátoru.

Tabulka 13: Vzniklé podfrakce F8-3-1, F-8-3-2 a jejich navážky

Frakce	Navážka
F8-3-1	10 mg
F8-3-2	139,9 mg

Při provedení kontrolního analytického TLC bylo opět zjištěno, že se nejedná o samostatnou čistou látku a podfrakce obsahuje směs více látek. (obrázek 16)



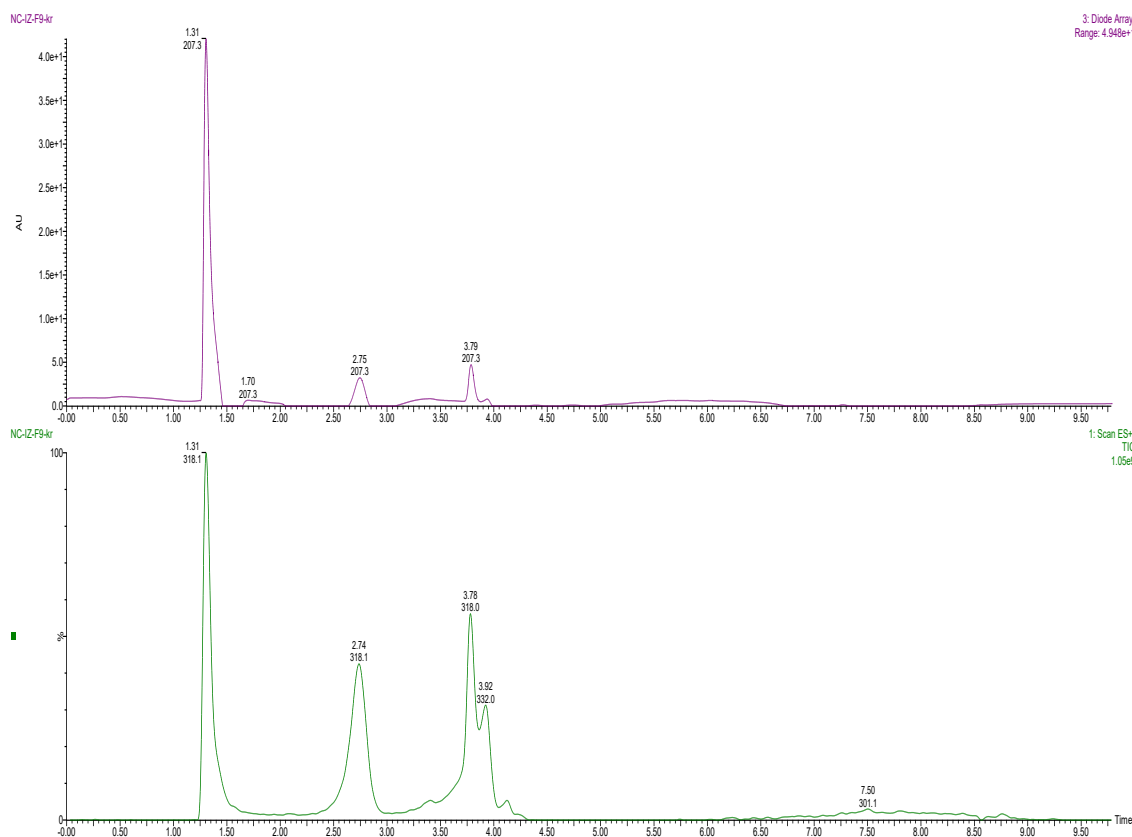
Obrázek 16: Kontrolní analytické TLC podfrakce F8-3-1, F8-3-2, MF: S17

Nastalo hledání vhodné mobilní fáze k ideálnímu oddělení skvrn a případnému opakování procesu přečišťování pomocí preparativního TLC. I přes použití reverzní nepolární C₁₈ stacionární fáze, nebyla nalezena vhodná mobilní fáze pro ideální oddělení.

4.5.2.5 Zpracování frakce 9

Frakce byla rozpuštěna v EtOH a CHCl₃ v poměru 1:1 a byla ponechána krystalizaci. Poté došlo k přefiltrování krystalů přes fritu, čímž došlo k oddělení krystalů od matečného louhu. Následně byly krystaly promyty malým množstvím rozpouštědla. Získané krystaly byly vloženy do exikátoru k dosušení. Celkové množství získaných krystalů činilo 90,9 mg. Po GC-MS analýze

bylo zjištěno, že krystaly nejsou zcela čisté a obsahují směs 4 látek, tudíž frakce byla znovu podrobena krystalizaci, tentokrát z čistého EtOH, ve snaze dokonalejšího přečistění. I přes zdánlivou čistotu krystalů při kontrole na TLC, jejich HPLC i NMR analýza ukázala přítomnost několika látek (obrázek 17). 35 mg krystalů bylo rozpuštěno a vyvinuto 2× na 3 komerčních TLC deskách v S18. Bylo získáno celkem 5 zón (tabulka 14), ale HPLC analýza ukázala, že složení všech zón je víceméně totožné a liší se pouze procentuálním zastoupením jednotlivých látek.



Obrázek 17: HPLC-MS analýza krystalů získaných z frakce NC F9

Tabulka 14: Vzniklé podfrakce F9 a jejich navážky

Frakce	Navážka
F9-1	3,5 mg
F9-2	9,8 mg
F9-3	5,6 mg
F9-4	6,2 mg
F9-5	2,3 mg

Největší podfrakce (F9-2) byla podrobena preparativní HPLC pomocí metody popsané v kapitole 4.3.9. Bylo získáno celkem 16 frakcí, jež byly následně spojeny do 9. Frakce 1-7 byly ponechány jednotlivě za vzniku frakcí F9-2-1 až F9-2-7. Frakce 8-10 byly spojeny do frakce

F9-2-8 a frakce 11-16 byly spojeny do frakce F9-2-9. Po ověření čistoty pomocí HPLC-MS bylo 2,12 mg F9-2-1 podrobena NMR analýze a bylo zjištěno, že se jedná o směs stereoizomerů alkaloidu homolykorinového strukturního typu lykoreninu. Látka byla označena jako **IZ-3**.

5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza izolovaných alkaloidů

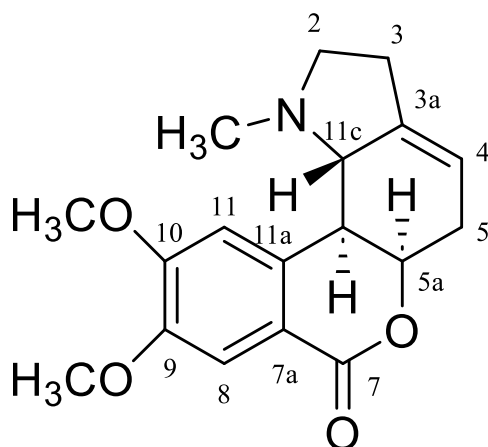
5.1.1 IZ-1: Homolykorin

Na základě provedených experimentů (GC-MS, NMR) a porovnáním získaných výsledků s dostupnou literaturou byla látka identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu homolykorin [119].

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁NO₄

Molekulová hmotnost: 315,369

Strukturní vzorec:



MS analýza:

MS (EI): m/z (%) = 206 (<1), 178 (1), 150 (1), 109 (100), 108 (20), 94 (3), 82 (3).

NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován na základě spekter uvedených v literatuře [119].

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{25} = 80^\circ$ (c = 0,02; CHCl₃)

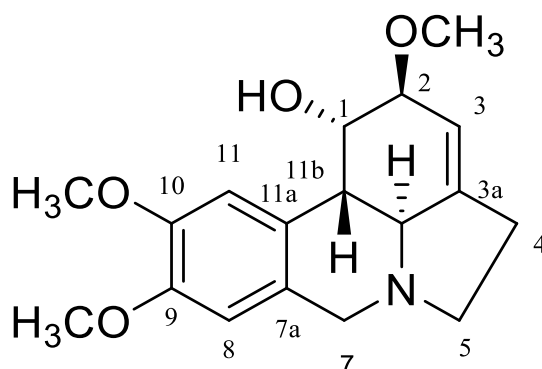
5.1.2 IZ-2: Galanthin

Na základě provedených experimentů (GC-MS, NMR) a porovnáním získaných výsledků s dostupnou literaturou byla látka identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu galanthin [120].

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄

Molekulová hmotnost: 317,39

Strukturní vzorec:



MS analýza:

MS (EI): m/z (%) = 317 (20), 316 (15), 298 (9), 268 (16), 243 (89), 242 (100), 228 (8).

NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován na základě spekter uvedených v literatuře [120].

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{25} = -56^\circ$ (c = 0,010; MeOH)

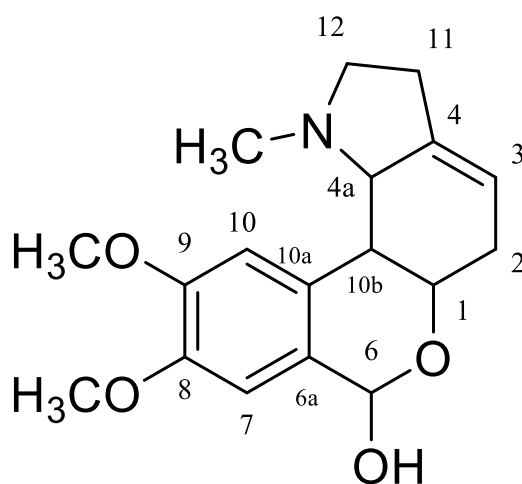
5.1.3 IZ-3: Lykorenin

Na základě provedených experimentů (GC-MS, HPLC-MS a NMR) a porovnáním získaných výsledků s dostupnou literaturou byla látka identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu lykorenin. Jedná se o směs dvou stereoizomerů.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄

Molekulová hmotnost: 317,38

Strukturní vzorec:



MS analýza:

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

MS (ESI): m/z (%) = 318 (M+1)

NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován na základě spekter uvedených v literatuře [119].

Optická otáčivost:

Jedná se o směs stereoizomerů, tudíž z tohoto důvodu nebyla optická otáčivost stanovena.

5.2 Biologická aktivita izolovaných látek

5.2.1 Biologická aktivita izolovaných látek vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3β.

Izolované alkaloidy byly podrobeny testům biologických aktivit, se zaměřením na inhibici enzymů spojených s AD. Konkrétně se jednalo o enzymy AChE, BuChE, POP a GSK-3β. Souhrn výsledků testovaných aktivit je zobrazen v tabulce 15.

Tabulka 15: Souhrn testovaných aktivit vůči enzymům spojeným s AD

Látka	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (μM)	GSK-3β (% inhibice)
Homolykorin	64 ± 4	151 ± 20	173 ± 41	54 ± 1
Galanthin	606,92 ± 60,45	> 1000	> 500	26 ± 8
Huperzin A ^a	0,033 ± 0,001	> 500	-	-
Galanthamin ^a	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	-	-
Berberin ^b	-	-	142 ± 21	-
Z-Pro-prolinal ^b	-	-	2,75 × 10 ⁻³	-

^astandard pro AChE a BuChE, ^bstandard pro POP

5.2.2 Cytotoxická aktivita izolovaných látek

U izolovaných látek byla testována cytotoxická aktivita vůči různým liniím nádorových a nenádorových buněk. Konkrétně byly použity buněčné linie Jurkat (akutní leukémie T lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom slinivky), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom), MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty). Přehled výsledků je uveden v tabulce 16.

Tabulka 16: Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči buňkám nádorových linií (viabilita buněk 48 hodin po ovlivnění alkaloidem při koncentraci 10 μM).

Látka	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5 ^b
Homolykorin	78	110	114	199	100	96	108	102	97	97
Galanthin	98	103	93	64	97	163	93	114	97	-
Doxorubicin ^a	0	0	66	77	59	5	7	41	73	40
DMSO (0,1 %) ^c	113	115	106	87	95	98	89	99	102	-

^astandard, ^c = 1 μmol/L; ^b kontrola-zdravé buňky; ^c kontrola – DMSO

6 DISKUSE A ZÁVĚR

AD je hlavní příčinou demence a rychle se stává jedním z nejzávažnějších onemocnění tohoto století [102]. Vzhledem k prodloužení průměrné délky života a k demografickému stárnutí populace, bude celosvětový výskyt AD nadále stoupat [121]. Do roku 2050 je předpokládáno až trojnásobné zvýšení případů pacientů s AD [102]. Rostoucí počet případů zdůrazňuje nutnost naléhavého hledání nových terapeutických možností. Stanovení nejefektivnější léčby AD zůstává náročným úkolem, který dosud nebyl zcela vyřešen [69]. Podílí se na tom multifaktoriální povaha onemocnění, která ztěžuje vývoj přesné a zejména včasné diagnózy a léčby modifikující onemocnění [74]. Patogeneze AD stále není zcela objasněna. Ačkoliv bylo navrženo několik hypotéz zabývajících se problematikou patofyziologie AD, je pravděpodobné, že jde o kombinaci více spouštěcích faktorů. Kromě včasného rozpoznání a snížení modifikovatelných rizikových faktorů, je tedy nezbytné studovat nové terapeutické cíle a léčiva na ně cílící [69].

V rámci této diplomové práce byla v návaznosti na disertační práci MSc. Abdullaha Al Mamun, Ph.D. [118] věnována pozornost alkaloidním frakcím z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton za účelem izolace alespoň 2 alkaloidních látek v čistém stavu. *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton je využíván jako komerční zdroj galanthaminu, který je schválen pro léčbu AD. Lze na něj ovšem pohlížet i jako na zdroj dosud neobjevených minoritních sloučenin. To bylo prokázáno objevem nových, unikátních struktur, konkrétně nazvaných jako karltonin A-E, které představují karltoninový strukturní typ. Některé z těchto sloučenin vykazují zajímavé aktivity vůči cholinesterasám, zejména vůči BuChE [65]. Zároveň byly tyto látky použity jako tzv. lead structures pro přípravu syntetických derivátů, které rovněž vykazovaly slibné aktivity v oblasti potenciální terapie AD [66], [67]. Toto poukazuje na fakt, že rostliny jsou stále zdrojem nových a doposud neobjevených sloučenin, které mohou mít perspektivní vlastnosti, a i přes minoritní zastoupení v rostlinném materiálu mohou být důležitým zdrojem inspirace, kudy se ve vývoji nových léčiv ubírat. Výzkum by mohl být do budoucna zaměřen na zkoumání těchto minoritních typů alkaloidů, popřípadě syntézu derivátů od nich odvozených.

Tato diplomová práce se nejprve zabývala frakcí NC-Ft, ze které se bohužel nepodařilo izolovat žádný alkaloid v čistém stavu. Hlavním limitem bylo malé množství jak už výchozího extraktu, tak následně zpracované podfrakce. Podfrakce Ft-5-2, která se jevila jako nejnadějnější, vážila pouhých 2,4 mg. Malé množství látky bránilo důkladnému přečištění

a separaci směsi alkaloidních látek. Z tohoto důvodu se dále práce zabývala frakcí, která byla po důkladné HPLC-MS analýze výsledkem spojení původních frakcí Fi, Fj3 a Narc/2. Bohužel se izolace alkaloidů i z těchto spojených frakcí ukázala být velmi problematická, zejména v důsledku rychlého rozkladu látek během izolace nebo v průběhu analytických metod. Řešením tohoto problému pro izolaci zbývajících alkaloidů z těchto frakcí by mohla být jejich stabilizace převedením na chloridy. Pomocí preparativních TLC a HPLC metod byly nakonec izolovány 3 alkaloidní látky. Na základě výsledků GC-MS, NMR a porovnání s literaturou byly alkaloidy identifikovány jako alkaloidy homolykorinového typu – konkrétně homolykorin (**IZ-1**) a lykorenin (**IZ-3**) a lykorinového strukturního typu – galanthin (**IZ-2**). Všechny alkaloidy byly již v minulosti izolovány a nalezeny i v ostatních zástupcích čeledi Amaryllidaceae. Homolykorin byl izolován například z *Narcissus poeticus* L., *Narcissus confusus* Pugsley, *Narcissus tazetta* L., *Narcissus tortifolius* Fern.Casas [36], *Narcissus* L. cv. Professor Einstein [122], *Narcissus primigenius* [123] či *Lycoris radiata* L. [119]. Galanthin lze nalézt například v *Narcissus serotinus* L. [124], *Narcissus poeticus* L., *Narcissus tazetta* L. [36], *Narcissus* L. cv. Professor Einstein [122] či v *Zephyranthes carinata* [125]. Lykorenin se nachází například v *Narcissus poeticus* L., *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem či *Lycoris radiata* L. [36], [119].

U izolované látky **IZ-3**, která byla následně identifikována jako lykorenin, se v rámci této diplomové práce nezabýváme biologickou aktivitou, jelikož se jednalo o směs stereoizomerů a množství izolované látky bylo příliš malé.

U ostatních izolovaných alkaloidů byla zkoumaná inhibiční aktivita ve vztahu k AChE, BuChE, POP a GSK-3 β . Pro srovnání inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE byly použity standardy galanthamin (IC₅₀ 1,7 \pm 0,1 μ M) a huperzin A (IC₅₀ 0,033 \pm 0,001 μ M). Jako standard pro srovnání inhibiční aktivity vůči POP sloužil Z-Pro-prolinal (IC₅₀ 2,75 \times 10⁻³ μ M) a berberin (IC₅₀ 142 \pm 21 μ M).

Výsledné hodnoty homolykorinu vykazují střední inhibiční aktivitu vůči AChE s hodnotou IC₅₀ 64 \pm 4 μ M. Inhibiční aktivita homolykorinu vůči BuChE je ve srovnání se standardy poměrně nízká a nabývá hodnot IC₅₀ 151 \pm 20 μ M. Homolykorin vykazuje zajímavou inhibiční aktivitu vůči POP s hodnotou IC₅₀ 173 \pm 41 μ M. Získaná inhibiční aktivita je téměř srovnatelná s inhibiční aktivitou POP alkaloidu berberinu (IC₅₀ = 142 \pm 21 μ M), který je používán jako standard pro porovnání aktivity látek přírodního původu. Hodnoty inhibičních aktivit galanthinu vůči AChE (IC₅₀ 606,92 \pm 60,45), BuChE (IC₅₀>1000) a POP (IC₅₀ >500) se jeví jako nevýznamné.

Izolované alkaloidy byly rovněž testovány z hlediska inhibiční aktivity vůči GSK-3 β . Homolykorin vykazuje relativně dobré výsledky s 54 ± 1 % inhibice GSK-3 β . Nicméně byly identifikovány alkaloidy homolykorinového typu, zejména masonin a 9-*O*-demethylhomolykorin, které vykazují slibnější výsledky vůči inhibici GSK-3 β [51]. Galanthin vykazuje slabou inhibiční aktivitu s hodnotou 26 ± 8 %, takže ani u jedné z látek nebyla stanovena hodnota IC₅₀ vůči tomuto enzymu.

Alkaloidy byly podrobeny také screeningu cytotoxického působení na deseti různých buněčných liniích. Konkrétně se jednalo o buněčné linie Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS. Linie zdravých plicních fibroblastů MRC-5 byla použita jako kontrolní. Jako standard byl použit doxorubicin o koncentraci 1 μ mol/L. V tomto případě galanthin vykázal pouze mírnou aktivitu vůči buňkám linie HT-29, jejíž viabilitu snížil na 64 %. V ostatních případech homolykorin ani galanthin nevykázaly aktivitu vůči žádné z testovaných linií.

Závěrem lze konstatovat, že izolované alkaloidy nevykazují dostatečnou inhibiční aktivitu, která by je činila perspektivními pro léčbu AD ani nádorových onemocnění. Vzhledem k šíři biologických účinků studovaných u řady jiných reprezentantů AA by stálo za to podrobit tyto alkaloidy dalším screeningovým testům jejich potenciální aktivity.

7 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Řešitel: Ivana Zelingerová

Školitel: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

Název diplomové práce: Alkaloidy *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton (Amaryllidaceae).

Izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita.

Klíčová slova: *Narcissus*, Amaryllidaceae, alkaloidy, izolace, biologická aktivita

V rámci této diplomové práce byl zpracováván alkaloidní extrakt z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton za účelem izolace alespoň 2 alkaloidů v čistém stavu. Pomocí metod preparativní TLC a HPLC byly izolovány 3 alkaloidní látky. Následně byly tyto látky identifikovány pomocí GC-MS, HPLC-MS a NMR analýzy jako alkaloidy homolykorinového strukturního typu – homolykorin a lykorenin a lykorinového strukturního typu – galanthin.

V rámci testů biologické aktivity byly izolované alkaloidy homolykorin a galanthin testovány pro jejich inhibiční aktivitu vůči enzymům, které se pojí s AD, konkrétně AChE, BuChE, POP a GSK-3 β . Pro srovnání inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE byly použity standardy galanthamin (IC_{50} $1,7 \pm 0,1 \mu M$) a huperzin A (IC_{50} $0,033 \pm 0,001 \mu M$). Jako standard pro srovnání inhibiční aktivity vůči POP sloužil Z-Pro-prolinal (IC_{50} $2,75 \times 10^{-3} \mu M$) a berberin (IC_{50} $142 \pm 21 \mu M$)

Z izolovaných alkaloidů, které byly testovány v rámci biologické aktivity, vykazoval nejzajímavější výsledky homolykorin a to především vůči POP, s hodnotami IC_{50} $173 \pm 41 \mu M$.

Cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů byla testována na devíti nádorových buněčných liniích, konkrétně Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2, přičemž jako kontrolní byla použita zdravá linie MRC-5. Žádný z izolovaných alkaloidů nevykázal významnou cytotoxickou aktivitu.

8 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Author: Ivana Zelingerová

Supervisor: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Alkaloids of *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton (Amaryllidaceae): isolation, structural identification, biological activity.

Key words: *Narcissus*, Amaryllidaceae, alkaloids, isolation, biological activity

In this thesis, an alkaloid extract from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton was processed with the aim of isolating at least two alkaloids in pure form. Using methods of preparative TLC and HPLC, three alkaloid compounds were isolated. These compounds were subsequently identified by GC-MS, HPLC-MS and NMR analyses as alkaloids of the homolycorine structural type – homolycorine and lycorenine and of the lycorine structural type – galanthine.

In biological activity assays, the isolated alkaloids homolycorine and galanthine were tested for their inhibitory activity against enzymes associated with AD, specifically AChE, BuChE, POP, and GSK-3 β . For comparison of inhibitory activity against AChE and BuChE, galanthamine (IC₅₀ 1.7 \pm 0.1 μ M) and huperzine A (IC₅₀ 0.033 \pm 0.001 μ M) were used as standards. Z-Pro-prolinal (IC₅₀ 2.75 \times 10⁻³ μ M) and berberine (IC₅₀ 142 \pm 21 μ M) were used as standards for comparison of inhibitory activity against POP.

Among the isolated alkaloids tested for biological activity, homolycorine showed the most interesting results, particularly against POP, with IC₅₀ values of 173 \pm 41 μ M.

The cytotoxic activity of the isolated alkaloids was tested on nine cancer cell lines, specifically Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, and SAOS-2, with the healthy cell line MRC-5 used as a control. None of the isolated alkaloids exhibited significant cytotoxic activity.

9 LITERATURA

- [1] Zupko, I., Rethy, B., Hohmann, J., Molnar, J., Ocsovszki, I., & Falkay, G. (2009). Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In vivo*, 23(1), 41-48.
- [2] Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International journal of herbal medicine*, 4, 59-64.
- [3] Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current trends in biotechnology and pharmacy*, 9, 293-304.
- [4] Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. (2015). Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*, 2, 1-15.
- [5] Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian journal of botany*, 1, 1-6.
- [6] Roy, A. (2017). A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *International Journal of Plant Biotechnology*, 3, 1-9.
- [7] Ng, Y. P., Or, T. C. T., & Ip, N. Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 89, 260-270.
- [8] Havlasová, J., Šafratová, M., Siatka, T., Štěpánková, Š., Novák, Z., Ločárek, M., Opletal, L., Hrabínová, M., Jun, D., Benešová, N., Kuneš, J., & Cahlíková, L. (2014). Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some Narcissus species and varieties and their biological activity. *Natural Product Communications*, 9, 1151–1155.
- [9] Hulcová, D., Maříková, J., Korábečný, J., Hošťálková, A., Jun, D., Kuneš, J., Chlebek, J., Opletal, L., Simone, De A., Nováková, L., Andrisano, V., Růžička, A., & Cahlíková, L. (2019). Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 165, 112055.
- [10] FÜRST, R. (2016). Narciclasine—an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. *Planta medica*, 82, 1389-1394.
- [11] Cahlíková, L., Ločárek, M., Benešová, N., Kučera, R., Chlebek, J., Novák, Z., & Opletal, L. (2013). Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid. *Natural Product Communications*, 8, 781–785.
- [12] Nair, J. J., & Van Staden, J. (2021). The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *South African journal of botany*, 136, 157-174.
- [13] Agostini-Costa, T. D. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites. In *Chromatography and Its Applications*. (pp. 131-164). InTech.
- [14] Jahodář, L. (2006). *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1225-9.
- [15] Gould, K. S. (2004). Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *BioMed Research International*, 2004, 314-320.

- [16] Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, *64*, 3-19.
- [17] Musilová, L., Uhlík, O., Macková, M., & Macek, T. (2012). Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik. *Chemické listy*, *106*, 1029-1033.
- [18] Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, *23*, 762.
- [19] Sireesha, B. A. D. R. I., Reddy, B. V., Basha, S. K., Chandra, K., Anasuya, D., & Bhavani, M. (2019). A review on pharmacological activities of alkaloids. *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*, *1*, 230-234.
- [20] Cushnie, T. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International journal of antimicrobial agents*, *44*, 377-386.
- [21] Naji, E. F., Abdulfatah, H. F., & Hashim, K. S. (2024). Plant Secondary Metabolites, Their Classification and Biological Roles: A Review. *Journal of University of Anbar for Pure Science*, *18*, 106–115.
- [22] Shi, Z., Zou, W., Zhu, Z., Xiong, Z., Li, S., Dong, P., & Zhu, Z. (2022). Tropane alkaloids (hyoscyamine, scopolamine and atropine) from genus *Datura*: Extractions, contents, syntheses and effects. *Industrial Crops and Products*, *186*, 115283.
- [23] Chan, T. Y. (2017). Worldwide occurrence and investigations of contamination of herbal medicines by tropane alkaloids. *Toxins*, *9*, 284.
- [24] Adibah, K. Z. M., & Azzreena, M. A. (2019). Plant toxins: alkaloids and their toxicities. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *6*, 021–029.
- [25] Diaz, G. J. (2015). Toxicosis by plant alkaloids in humans and animals in Colombia. *Toxins*, *7*, 5408-5416.
- [26] Schardl, C. L. (2015). Introduction to the toxins special issue on ergot alkaloids. *Toxins*, *7*, 4232-4237.
- [27] Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., & Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 505–567.
- [28] Bhambhani, S., Kondhare, K. R., & Giri, A. P. (2021). Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. *Molecules*, *26*, 3374.
- [29] Rajput, A., Sharma, R., & Bharti, R. (2022). Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health. *Materials Today: Proceedings*, *48*, 1407-1415.
- [30] Jin, Z., & Yao, G. (2019). Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Natural Product Reports*, *36*, 1462-1488.

- [31] Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. (2013). Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 107, 701-708.
- [32] Bledule jarní. (2024). Květena ČR [online]. [cit. 2024-06-09]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=2>.
- [33] Al Mamun, A., Maříková, J., Hulcová, D., Janoušek, J., Šafratová, M., Nováková, L., Kučera, T., Hrabínová, M., Kuneš, J., Korábečný, J. & Cahlíková, L. (2020). Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules*, 10, 800.
- [34] Nair, J. J. & Van Staden, J. (2021). The Amaryllidaceae, a chemically and biologically privileged plant family. *South African Journal of Botany*, 136, 1-194.
- [35] Cahlíková, L., Vrabec, R., Pidaný, F., Peřinová, R., Maafi, N., Mamun, A. A., Ritomská, A., Wijaya, V. & Blunden, G. (2021). Recent progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules*, 26, 5240.
- [36] Bastida, J., Lavilla, R., & Viladomat, F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology*, 63, 87-179.
- [37] Takos, A. M., & Rook, F. (2013). Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International journal of molecular sciences*, 14, 11713-11741.
- [38] Desgagné-Penix, I. (2021). Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review. *Phytochemistry Reviews*, 20, 409-431.
- [39] Berkov, S., Osorio, E., Viladomat, F., & Bastida, J. (2020). Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology*, 83, 113-185.
- [40] Al Mamun, A., Maříková, J., Hulcová, D., Janoušek, J., Šafratová, M., Nováková, L., Kučera, T., Hrabínová, M., Kuneš, J., Korábečný, J. & Cahlíková, L. (2020). Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules*, 10, 800.
- [41] Havlasová, J., Šafratová, M., Siatka, T., Štěpánková, Š., Novák, Z., Ločárek, M., Opletal, L., Hrabínová, M., Jun, D., Benešová, N., Kuneš, J., & Cahlíková, L. (2014). Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Natural Product Communications*, 9, 1151-1155.
- [42] Torras Claveria, L., Tallini, L. R., Viladomat Meya, F., & Bastida Armengol, J. (2017). Chapter 5: Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII*. (pp. 69-82). Research Singpost.
- [43] Chang, X., Ferdausi, A., Das, A., & Jones, M. (2022). Biologically active Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton and Andrew's Choice dormant bulbs. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 13, 144-155.

- [44] Narcis žlutý. (2024). Biolib [online]. [cit. 2024-06-07] Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id42018/>.
- [45] Boshra, Y. R., Fahim, J. R., Hamed, A. N. E., & Desoukey, S. Y. (2022). Phytochemical and biological attributes of *Narcissus pseudonarcissus* L. (Amaryllidaceae): a review. *South African Journal of Botany*, 146, 437-458.
- [46] NARCISSUS PSEUDONARCISSUS L. (2010). BOTANY.cz [online] [cit. 2024-07-26]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/narcissus-pseudonarcissus/>.
- [47] Ferdinand Vietz Icones Plantarum 1800-1822, Daffodil, *Narcissus pseudonarcissus*. (2024). Antique Botanical Prints, Rare Antique Prints from Panteek [online]. [cit. 2024-06-07]. Dostupné z: <https://panteek.com/Vietz/pages/vi204-141.htm>.
- [48] Berkov, S., Denev, R., Sidjimova, B., Zarev, Y., Shkondrov, A., Torras-Claveria, L., Viladomat, F. & Bastida, J. (2023). Gas chromatography–mass spectrometry of some homolycorine-type Amaryllidaceae alkaloids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 37, e9506.
- [49] Abdelbagi, M. E., Al-Mazaideh, G. M., Ahmed, A. E., Al-Rimawi, F., Ayyal Salman, H., Almutairi, A., Abuilaiwi, F.A. & Wedian, F. (2023). Exploring *Securigera securidaca* Seeds as a Source of Potential CDK1 Inhibitors: Identification of Hippeastrine and Naringenin as Promising Hit Candidates. *Processes*, 11, 1478.
- [50] Yang, Y., Liu, Q., Guo, X., Yuan, Q., Nian, S., Kang, P., Xu, Z., Li, L., & Ye, Y. (2022). Systematic Pan-Cancer Analysis Identifies CDK1 as an Immunological and Prognostic Biomarker. *Journal of oncology*, 2022, 8115474.
- [51] Hulcová, D., Breiterová, K., Siatka, T., Klímová, K., Davani, L., Šafratová, M., Hošťálková, A., Simone, D. A., Andrisano, V. & Cahlíková, L. (2018). Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules*, 23, 719.
- [52] Singh, D. P., Singh, A. K. & Singh, A. (2021). Chapter 1: Plant breeding: past, present, and future perspectives. In *Plant Breeding and Cultivar Development*. (pp.1-24). Academic Press.
- [53] Pečinka, A. (2020). Jaká bude budoucnost šlechtění rostlin? [online] Nová Botanika. [cit. 2024-06-15]. Dostupné z: https://www.novabotanika.eu/Slechteni_rostlin.html.
- [54] Artificial Selection. (2024). National Geographic [online] [cit. 2024-06-15]. Dostupné z: <https://education.nationalgeographic.org/resource/artificial-selection/>.
- [55] *Narcissus* Carlton / daffodil. (2024). Holland Biodiversity [online] [cit. 2024-06-07]. Dostupné z: <https://hollandbiodiversity.com/product/narcissus-carlton/>.
- [56] Koide, Y., Kuniyoshi, D., & Kishima, Y. (2020). Fertile tetraploids: new resources for future rice breeding? *Frontiers in plant science*, 11, 1231.
- [57] Atrahimovich, D., Harris, R., Eitan, R., Cohen, M., & Khatib, S. (2021). Galantamine Quantity and Alkaloid Profile in the Bulbs of *Narcissus tazetta* and daffodil cultivars (Amaryllidaceae) Grown in Israel. *Metabolites*, 11, 185.

- [58] Tallini, L. R., Manfredini, G., Rodríguez-Escobar, M. L., Ríos, S., Martínez-Francés, V., Feresin, G. E., Borges, S.D.W., Bastida, J., Viladomat, F. & Torras-Claveria, L. (2024). The Anti-Cholinesterase Potential of Fifteen Different Species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae) Collected in Spain. *Life*, *14*, 536.
- [59] Ivanov, I., Berkov, S., Pavlov, A., & Georgiev, V. (2019). In situ galanthamine extraction during the cultivation of *Leucojum aestivum* L. shoot culture in two-phase bubble column cultivation system. *Engineering in Life Sciences*, *19*, 1000-1005.
- [60] Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (2009). Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *23*, 1170-1176.
- [61] Akram, M. N., Verpoorte, R., & Pomahačová, B. (2021). Effect of bulb age on alkaloid contents of *Narcissus pseudonarcissus* bulbs. *South African Journal of Botany*, *136*, 182-189.
- [62] Lubbe, A., Pomahačová, B., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Analysis of metabolic variation and galanthamine content in *Narcissus* bulbs by ¹H NMR. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, *21*, 66-72.
- [63] Lubbe, A., Choi, Y. H., Vreeburg, P., & Verpoorte, R. (2011). Effect of fertilizers on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs by ¹H NMR. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*, 3155-3161.
- [64] Lubbe, A., Gude, H., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Seasonal accumulation of major alkaloids in organs of pharmaceutical crop *Narcissus Carlton*. *Phytochemistry*, *88*, 43-53.
- [65] Křoustková, J., Ritomská, A., Al Mamun, A., Hulcová, D., Opletal, L., Kuneš, J., Cahlíková, L. & Bucar, F. (2022). Structural analysis of unusual alkaloids isolated from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Phytochemistry*, *204*, 113439.
- [66] Mamun, A. A., Pidaný, F., Hulcová, D., Maříková, J., Kučera, T., Schmidt, M., Catapano, C.M., Hrabínová, M., Jun, D., Múčková, L., Kuneš, J., Janoušek, J., Andrýs, R., Nováková, L., Peřínová, R., Maafi, N., Soukup, O., Korábečný, J. & Cahlíková, L. (2021). Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis, biological activity evaluation, and docking studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 8308.
- [67] Pidaný, F., Křoustková, J., Jenčo, J., Breiterová, K. H., Múčková, L., Nováková, L., Kuneš, J., Fibigar, J., Kučera, T., Novák, M., Šorf, A., Hrabínová, M., Pulkrábková, L., Janoušek, J., Soukup, O., Jun, D., Korábečný, J., & Cahlíková, L. (2024). Carltonine-derived compounds for targeted butyrylcholinesterase inhibition. *RSC Medicinal Chemistry*, *15*, 1601-1625.
- [68] Fišar, Z., & Hroudová, J. (2024). Alzheimerova nemoc: Patofyziologie a hypotézy, *Česká a Slovenská Psychiatrie*, *120*, 33–45.
- [69] Kim, A. Y., Al Jerdi, S., MacDonald, R., & Triggle, C. R. (2024). Alzheimer's disease and its treatment—yesterday, today, and tomorrow. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1399121.

- [70] Silva, T., Reis, J., Teixeira, J., & Borges, F. (2014). Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. *Ageing research reviews*, 15, 116-145.
- [71] Jiráček, R. (2008). Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 9, 240-244.
- [72] Zvěřová, M. (2017). *Alzheimerova demence*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0561-8.
- [73] Bucciarelli, A. (2015). Chapter 1: Alzheimer's Disease Basics. In *Alzheimer's Disease* (pp. 1-9). Berlin, Boston: Mercury Learning and Information.
- [74] Samanta, S., Ramesh M., & Govindaraju T. (2022). Chapter 1: Alzheimer's is a Multifactorial Disease. In *Alzheimer's Disease: Recent Findings in Pathophysiology, Diagnostic and Therapeutic Modalities* (pp. 1-34). The Royal Society of Chemistry.
- [75] Alzheimerova nemoc. (2024). Česká Alzheimerovská společnost. [online]. [cit. 2024-07-14]. Dostupné z: <https://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/co-je-demence/alzheimerova-nemoc/>
- [76] Dementia facts & figures. (2024). Alzheimer's disease international. [online] [cit. 2024-08-19]. Dostupné z: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/>.
- [77] Ageing Europe – statistics on population developments. (2023). Eurostat, statistic explained. [online] [cit. 2024-08-19] Dostupné z: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Ageing_Europe_-_statistics_on_population_developments.
- [78] Korábečný, J., Soukup, O., & Vališ, M. (2020). *Alzheimerova nemoc: patofyziologie, klinika, farmakoterapie* Jessenius. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-643-6.
- [79] 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 19, 1598–1695.
- [80] Jiráček, R., Holmerová, I., & Borzová C. (2009). *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2454-6.
- [81] Sen, D., Rathee, S., Pandey, V., Jain, S. K., & Patil, U. K. (2024). Comprehensive Insights into Pathophysiology of Alzheimer's Disease: Herbal Approaches for Mitigating Neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*, 21, e150424228887
- [82] Abdallah, A. E. (2024). Review on anti-alzheimer drug development: approaches, challenges and perspectives. *RSC advances*, 14, 11057-11088.
- [83] Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *science*, 314, 777-781.
- [84] Jiráček R., & Manukyan A. (2017). Hledání farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká a Slovenská Psychiatrie*, 113, 79–83.
- [85] What happens to the brain in Alzheimer's disease. (2024). National Institute on Aging [online]. US Department of Health and Human Services [cit. 2024-07-13]. Dostupné z:

<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-causes-and-risk-factors/what-happens-brain-alzheimers-disease>.

- [86] Jiráček R. (2009). Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, 19
- [87] Tau protein. (2024). Národní zdravotnický informační portál [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [cit. 2024-07-13]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/4075>.
- [88] Maccioni, R. B., Farías, G., Morales, I., & Navarrete, L. (2010). The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Archives of medical research*, 41, 226-231.
- [89] Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A.S., Vergallo, A., Cavado, E., Snyder, P.J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141, 1917-1933.
- [90] Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules*, 25, 5789.
- [91] Chen, Z. R., Huang, J. B., Yang, S. L., & Hong, F. F. (2022). Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. *Molecules*, 27, 1816.
- [92] Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57, 1041-1048.
- [93] Petrovič, M., Sedláček, M., Horák, M., & Vyklický, L. (2005). Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klinická farmakologie a farmacie*, 18, 81-89.
- [94] Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842, 1240-1247.
- [95] Nguyen, T. T., Ta, Q. T. H., Nguyen, T. K. O., Nguyen, T. T. D., & Van Giau, V. (2020). Type 3 diabetes and its role implications in Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 21, 3165.
- [96] Zeman, M., & Jiráček R. (2012). Alzheimerova choroba a diabetes mellitus typu 2. *Neurologie pro praxi*, 13, 105-108.
- [97] De la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. *Journal of diabetes science and technology*, 2, 1101-1113.
- [98] Hooper, C., Killick, R., & Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 104, 1433-1439.
- [99] Saraswati, A. P., Hussaini, S. A., Krishna, N. H., Babu, B. N., & Kamal, A. (2018). Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: Potential target for various therapeutic conditions. *European journal of medicinal chemistry*, 144, 843-858.

- [100] Teli, D. M., & Gajjar, A. K. (2023). Glycogen synthase kinase-3: A potential target for diabetes. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 92, 117406.
- [101] Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368, 387–403.
- [102] Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397, 1577-1590.
- [103] Franková, V. (2015). Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*, 16, 79–82.
- [104] Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25, 59-70.
- [105] Chohan, M. O., Khatoon, S., Iqbal, I. G., & Iqbal, K. (2006). Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine. *FEBS letters*, 580, 3973-3979.
- [106] Walsh, S., Merrick, R., Milne, R., & Brayne, C. (2021). Aducanumab for Alzheimer's disease? *Bmj*, 374.
- [107] FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. (2021). US Food and Drug administration. [online] [cit. 2024-08-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/our-perspective/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>.
- [108] Aducanumab to Be Discontinued as an Alzheimer's Treatment. (2024). Alzheimer's association. [online] [cit. 2024-08-02]. Dostupné z: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/aducanumab>
- [109] Biogen to Realign Resources for Alzheimer's Disease Franchise. (2024). GlobeNewswire. [online] [cit. 2024-08-02]. Dostupné z: <https://www.globenewswire.com/news-release/2024/01/31/2821003/0/en/Biogen-to-Realign-Resources-for-Alzheimer-s-Disease-Franchise.html>
- [110] FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Disease Treatment. (2023). US Food and Drug administration. [online] [cit. 2024-08-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-disease-treatment>.
- [111] FDA Converts Novel Alzheimer's Disease Treatment to Traditional Approval. (2023). US Food and Drug administration. [online] [cit. 2024-08-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-converts-novel-alzheimers-disease-treatment-traditional-approval>.
- [112] Leqembi. (2024). European Medicines Agency. [online] [cit. 2024-08-02]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/leqembi>.

- [113] Cummings, J., Apostolova, L., Rabinovici, G. D., Atri, A., Aisen, P., Greenberg, S., Hendrix, S., Selkoe, D., Weiner, M., Petersen, R.C., & Salloway, S. (2023). Lecanemab: appropriate use recommendations. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, *10*, 362-377.
- [114] Siatka, T., Adamcová, M., Opletal, L., Cahlíková, L., Jun, D., Hrabínová, M., Kuneš, J., & Chlebek, J. (2017). Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules*, *22*, 1181.
- [115] Tallini, L. R., das Neves, G. M., Vendruscolo, M. H., Rezende-Teixeira, P., Borges, W., Bastida, J., Costa-Lotufo, L.V., Eifler-Lima, V.L., & Zuanazzi, J. A. S. (2024). Antitumoral activity of different Amaryllidaceae alkaloids: In vitro and in silico assays. *Journal of Ethnopharmacology*, *329*, 118154.
- [116] Ingrassia, L., Lefranc, F., Dewelle, J., Pottier, L., Mathieu, V., Spiegl-Kreinecker, S., Sauvage, S., Yazidi, M.E., Dehoux, M., Berger, W., Quaquebeke, E.V., & Kiss, R. (2009). Structure – activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryril derivative) as potential anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry*, *52*, 1100-1114.
- [117] Habartová, K., Cahlíková, L., Řezáčová, M., & Havelek, R. (2016). The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications*, *11*, 1587-1594.
- [118] Al Mamun A. (2022) Amaryllidaceae alkaloidy rodu *Narcissus* a jejich biologická aktivita. Hradec Králové. Doktorská disertační práce. Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova.
- [119] Huang, S. D., Zhang, Y., Hong-Ping, H. E., Shi-Fei, L. I., Gui-Hua, T. A. N. G., Duo-Zhi, C. H. E. N., Ming-Ming, C.A.O., Ying-Tong, D.I., Xiao-Jiang, H. A. O. (2013). A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chinese journal of natural medicines*, *11*, 406-410.
- [120] Abou-Donia, A. H., Darwish, F. A., Amer, M. E., Kassem, F. F., Hammada, H. M., & Shin, Y. G. (2002). Alkaloids From *Narcissus* cv. Ice Follies Cultivated in Egypt. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, *16*, 96-98.
- [121] Zhang, X. X., Tian, Y., Wang, Z. T., Ma, Y. H., Tan, L., & Yu, J. T. (2021). The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, *8*, 313-321.
- [122] Breiterová, K., Koutová, D., Maříková, J., Havelek, R., Kuneš, J., Majorošová, M., Opletal, L., Hošťálková, A., Jenčo, J., Řezáčová, M., & Cahlíková, L. (2020). Amaryllidaceae alkaloids of different structural types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and their cytotoxic activity. *Plants*, *9*, 137.
- [123] Bastida, J., Bergoñón, S., Viladomat, F., & Codina, C. (1994). Alkaloids from *Narcissus primigenius*. *Planta medica*, *60*, 95-96.
- [124] Pigni, N. B., Rios-Ruiz, S., Martinez-Frances, V., Nair, J. J., Viladomat, F., Codina, C., & Bastida, J. (2012). Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *Journal of Natural Products*, *75*, 1643-1647.
- [125] Sierra, K., De Andrade, J. P., Tallini, L. R., Osorio, E. H., Yañéz, O., Osorio, M. I., Oleasi, N. H., García-Beltrán, O., Borges, W. D. S., Bastida, J., Osorio, E., & Cortes, N. (2022). In vitro and in

silico analysis of galanthine from *Zephyranthes carinata* as an inhibitor of acetylcholinesterase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113016.