

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní identifikace, biologická
aktivita. II**

**Alkaloids of Amaryllidaceae family: isolation, structural identification,
biological activity. II**

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

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

Hradec Králové, srpen 2017

Eliška Kohelová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým samostatně vypracovaným autorským dílem. Veškerá literatura a ostatní zdroje, z nichž jsem při jejím zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou řádně citovány.

V Hradci Králové, srpen 2017

.....

Podpis

Děkuji grantům SVV UK 260 063 a SVV UK 260 184, bez jejichž finanční podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Chtěla bych na tomto místě poděkovat Doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za poskytnuté materiály, interpretaci MS spekter, odborné rady a vstřícný přístup při zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Breiterové za odbornou pomoc při praktickém zpracování diplomové práce. Tímto děkuji Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi za změření biologických aktivit alkaloidních extraktů a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, PhD. z Katedry organické a bioorganické chemie za změření a interpretaci NMR spekter. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a pomoc při řešení diplomové práce.

Obsah

1	ÚVOD.....	6
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Čeleď Amaryllidaceae	9
3.1.1	Taxonomické řazení a klasifikace	10
3.1.2	Amarylkovité alkaloidy	10
3.1.3	Biosyntéza	11
3.1.4	Rod <i>Narcissus</i>	13
3.1.5	Hlavní představitelé jednotlivých strukturních typů amarylkovitých alkaloidů rostlin rodu <i>Narcissus</i> a jejich biologická aktivita	18
3.2	Alzheimerova choroba.....	28
3.2.1	Patofyziologie Alzheimerovy nemoci	28
3.2.2	Terapie Alzheimerovy nemoci.....	33
4	Experimentální část.....	43
4.1	Všeobecné postupy	43
4.1.1	Destilace a odpařování.....	43
4.1.2	Materiál a vybavení.....	43
4.2	Příprava sumárního extraktu	44
4.2.1	Biologický materiál	44
4.2.2	Příprava ethanolickeho a alkaloidního extraktu	45
4.2.3	Sloupcová chromatografie a izolace jednotlivých alkaloidů	45
4.2.4	Zpracování frakce F6	48
4.2.5	Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů	52
4.2.6	Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů	53
5	VÝSLEDKY	57
5.1	GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí <i>Narcissus</i> cv. PROFESSOR EINSTEIN ..	57
5.2	Strukturní analýza izolovaných alkaloidů	57
5.2.1	Strukturní analýza galanthaminu	57
5.2.2	Strukturní analýza karaninu	58
5.2.3	Strukturní analýza pluviinu.....	59
5.3	Výsledky provedených biologických testů ve vztahu k Alzheimerově chorobě.....	60
5.4	Cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů	60

5.5	Antimikrobiální a antifungální aktivita izolovaných alkaloidů.....	61
5.6	Antimalarická aktivita izolovaných alkaloidů	61
6	DISKUSE A ZÁVĚR	62
7	LITERATURA.....	65
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	76

1 ÚVOD

Již od nepaměti využívá člověk rostliny nejen jako zdroj obživy, ale i pro jejich léčebné účinky. Empirickou formou šťastných náhod a tragických omylů se postupně vyseletovala celá řada léčivých rostlin. Staří Sumerové, Babyloňané a Asyřané znali mnoho těchto rostlin a používali je surové a nijak nezpracované. V otrokářské a feudální společnosti byly zpracovávány konkrétní části těchto rostlin na odvary a výluhy, avšak podstata léčivého účinku zůstala neznámá. S postupným vývojem společnosti rostla úroveň vzdělání a dostupných technologií, které umožnily izolovat obsahové látky, tedy zdroj léčebných nebo toxických vlastností každé rostliny. Nejslavnějším obdobím pro dějiny farmakognosie byl přelom 18. a 19. století. Mnoho tehdejších badatelů pocházelo z řad lékárníků, jako příklad lze uvést Andreamu Marggrafa, který je známý jako objevitel sacharózy v cukrové řepě. Tanin v duběnkách objevil a izoloval Nicolas Deyeux. Objevitel morfinu (1804) a mekonové kyseliny Friedrich Sertürner pocházel také z řad lékárníků. Lékárník a profesor chemie Joseph Bienaimé Caventou a pařížský lékárník Pierre Joseph Pelletier společně objevili chinin (1820), cinchonin, brucin a strychnin. Univerzitní lékárník v Heidelbergu Philipp Lorenz Geiger a chemik O. Hesse izolovali atropin (1833), hyoscyamin, kolchicin a akonitin¹.

Většinu uvedených sloučenin řadíme do skupiny látek, které se označují jako alkaloidy. Jedná se o sekundární metabolity, jejichž biosyntéza vychází z aminokyselin. Alkaloidy se vyskytují převážně ve vyšších rostlinách, ale byly prokázány také v plavuních (např. *Lycopodium spp.*), přesličkách (*Equisetum spp.*) a houbách (*Claviceps purpurea*). U živočichů jsou alkaloidy vzácné. Dosud byly alkaloidy nalezeny ve více než 4000 rostlinných druzích, odhaduje se, že asi 10-20 % všech rostlin obsahuje alkaloidy. Význam alkaloidů pro rostlinu není jednoznačně vysvětlen. Dříve byly alkaloidy považovány za odpadní produkty rostlinného organismu. Dalším názorem je, že jejich prudký toxický účinek může být ochranou proti býložravcům a parazitům. Lze to však potvrdit jen na několika příkladech, neboť je mnohem více rostlin, kterým alkaloidy žádnou ochranu neposkytují. Domněnky o biologické úloze alkaloidů však nelze přijmout jako obecně platné, vzhledem ke značné rozmanitosti mezi alkaloidy².

Jednou z významných čeledí z hlediska obsahu alkaloidů je čeleď Amaryllidaceae. Tyto sloučeniny jsou označovány jako amaryllkovité alkaloidy. Formálně jsou řazeny mezi isochinolinové alkaloidy, protože jejich syntéza vychází z tyrosinu. Amaryllkovité alkaloidy vykazují celou řadu biologických účinků, mezi nejvýznamnější můžeme zařadit aktivity

antivirotické, antimalarické, cytotoxické a inhibiční účinek na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu³. V současnosti je jediným klinicky užívaným amarylkovitým alkaloidem galanthamin, uplatňuje se jako inhibitor acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy v terapii Alzheimerovy choroby. Tento duální způsob inhibice cholinesteráz se jeví slibně v léčbě tohoto neurodegenerativního onemocnění, neboť z cholinergní hypotézy vyplývá, že mimo jiné dochází i ke zvýšení koncentrace butyrylcholinesterázy. Z tohoto důvodu je vhodné hledat mezi amarylkovitými alkaloidy další potenciálně využitelné inhibitory těchto enzymů.

V rámci své diplomové práce jsem nastínila další perspektivní terapeutické možnosti léčby Alzheimerovy choroby, např. inhibitory prolyl oligopeptidasy, látky cílící na beta-amyloid nebo inhibitory enzymu GSK3 β . Tato práce je zaměřená na látky přírodního původu a jejím cílem byla izolace Amaryllidaceae alkaloidů za účelem jejich biologického testování.

2 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

1. Podíl na přípravě sumárního alkaloidního extraktu z rostliny *Narcissus* cv. Professor Einstein a primární sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu.
2. Zpracování zadané frakce za účelem izolace alespoň dvou alkaloidů v čistém stavu.
3. Strukturní identifikace izolovaných látek (MS, NMR, optická otáčivost apod.)
4. Příprava izolovaných látek pro co nejširší spektrum biologických aktivit. Zpracování všech získaných výsledků, jejich analýza a vyhodnocení.
5. Sepsání a odevzdání diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Čeleď Amaryllidaceae

Amarylkovité je čeleď krytosemenných rostlin z řádu chřestotvaré (Asparagales). Čeleď zahrnuje asi 1100 víceletých druhů cibulovitých rostlin náležících do přibližně 85 rodů⁴. V souvislosti s činností Angiosperm Phylogeny Group (APG) se tato čeleď v rámci nové klasifikace (APG III) v roce 2009 rozšířila o dříve samostatné čeledi kalokvětovité (Agapanthaceae) a česnekovité (Alliaceae), které byly v rámci APG III překlasifikovány na podčeledi Agapanthoideae a Allioideae⁵.

Jedná se zpravidla o vytrvalé rostliny s podzemními cibulemi, oddenky nebo cibulovými hlízami. Stonek je bezlistý (stopka nebo stvol) s výjimkou zástupců rodu *Ixiolirion*⁶. Listy jsou přízemní, úzké, většinou čárkovité (jen velmi omezeně lodyžní). Květy bývají jednotlivé, jsou oboupohlavné, aktimorfni nebo náznakově zygomorfni, se spodním semeníkem. Okvětí je ze šesti lístků (3+3), které mohou být srostlé, tyčinek 3+3, semeník je spodní ze tří plodolistů. Květenství jsou zpravidla šroubelovitá nebo hroznovitá. Plodem je tobolka nebo bobule⁶.

Na našem území se můžeme setkat s rostlinami z rodů sněženek (*Galanthus*), narcisů (*Narcissus*) a bledulí (*Leucojum*), (**Obr. 1**). Z důvodu estetického vzezření je celá řada těchto rostlin pěstována pro okrasné účely (např. *Clivia*, *Hippeastrum*, *Amaryllis* atd.)^{5, 6}.



Obrázek 1.: Rostliny čeledi Amaryllidaceae vyskytující se na území ČR, zleva *Galanthus nivalis*⁷, *Leucojum vernum*⁸, *Narcissus poeticus*⁹

3.1.1 Taxonomické řazení a klasifikace¹⁰

Říše: rostliny (Plantae)

Podříše: cévnaté rostliny (Tracheobionta)

Oddělení: krytosemenné (Magnoliophyta)

Třída: jednoděložné (Liliopsida)

Řád: chřestotvaré (Asparagales)

Čeleď: amarylkovité (Amaryllidaceae)

3.1.2 Amarylkovité alkaloidy

Jednou z charakteristik této čeledi je přítomnost strukturně jedinečné skupiny alkaloidů, které byly izolovány z rostlin všech rodů této čeledi¹¹. Tyto sloučeniny jsou označovány jako amarylkovité alkaloidy (AAs) a reprezentují rozsáhlou, stále rostoucí skupinu isochinolinových alkaloidů, které vykazují mnoho biologických účinků¹². Mezi nejvýznamnější můžeme zařadit aktivity antivirotické, antimalarické, cytotoxické a inhibiční účinek na acetylcholinesterázu⁷. Rostliny čeledi amarylkovitých jsou používány v tradiční rostlinné medicíně tisíce let. První záznam o jejich medicínském využití je datován již do 4. století před Kristem, kdy Hippokrates z Kósu využil olejový extrakt z narcisu (*Narcissus poeticus*) k léčbě děložních nádorů. Od izolace prvního alkaloidu lykorinu roku 1877 bylo izolováno a strukturně popsáno více než 500 alkaloidů vyskytujících se jednotlivě, nebo ve skupinách napříč celou čeledí¹³. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, avšak v nejvyšším množství je najdeme v cibuli¹⁴.

Fyzikálně-chemické charakteristiky těchto alkaloidů lze shrnout do několika bodů. Základní struktura je složená ze stavebních kamenů C6-C1 a N-C2-C6, které jsou odvozeny od L-fenylalaninu a L-tyrosinu (v daném pořadí). Alkaloidy mají charakter slabých bází (pKa dosahuje hodnot 6-9). Převážná část doposud izolovaných Amaryllidaceae alkaloidů obsahuje pouze jeden atom dusíku, který je sekundární, terciární nebo kvartérní. V posledních letech byly izolovány z rostlin rodu *Narcissus* i alkaloidy, které v sobě kombinují dva strukturní typy a v jejich molekule je možné nalézt dva atomy dusíku. Počet atomů uhlíku kolísá v rozmezí 16-20¹⁵.

3.1.3 Biosyntéza

Většina biosyntetického výzkumu AAs byla provedena v šedesátých a na počátku sedmdesátých let. V dnešní době máme rozsáhlé informace o účincích AAs, ale informace o jejich molekulární genetice a biochemických procesech jsou neúplné. První kroky biosyntézy se podařilo objasnit ve studiích s radioaktivně značenými prekurzory¹⁶. Stejně jako ve většině metabolických drah vedoucích k syntéze alkaloidů, probíhá i tato biosyntéza v několika základních krocích, které zahrnují enzymatickou přípravu prekurzorů, primární cyklizační mechanismy, enzymatickou přípravu meziproduktů a sekundární cyklizaci a diferenciaci struktur¹².

Enzymatická příprava prekurzorů

Substráty, ze kterých vycházejí první kroky biosyntézy, jsou odvozeny z primárního metabolismu aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu¹⁶. I když jsou si L-fenylalanin a L-tyrosin strukturně velmi podobné, nejsou v rostlinách vzájemně zaměnitelné¹⁵.

L-Fenylalanin je katalyzován enzymem fenylalanin-lyázou (PAL), čímž dochází ke vzniku *trans*-skořicové kyseliny za současné ztráty amoniaku. Následují dva hydroxylační kroky, na kterých se podílejí enzymy cinnamát-4-hydroxyláza (Ca4H) a kumarát-3-hydroxyláza (Ca3H), doprovázené ztrátou dvou atomů uhlíku. Tato kaskáda vede ke vzniku 3,4-dihydroxybenzaldehydu (3,4-DHBA). Na straně druhé je dekarboxylován L-tyrosin tyrosin-dekarboxylázou (TYDC) na tyramin. TYDC je klíčovým enzymem v mnoha rostlinách produkujících alkaloidy, příkladem jsou velmi dobře známá analgetika morfin a kodein^{15, 16}.

Primární cyklizační mechanismy

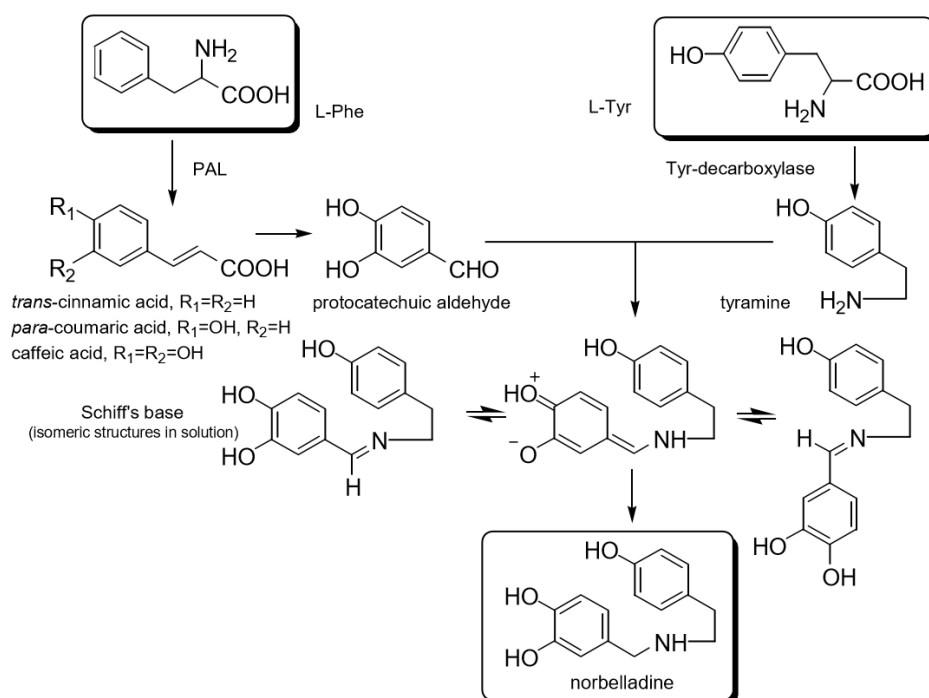
Tyramin a 3,4-DHBA nebo jeho deriváty představují výchozí složky pro biosyntézu základního prekurzoru norbelladinu. Spojením tohoto aminu a aldehydu vzniká Schiffova báze. Kraugsodin a isokraugsodin představují dvě konkrétní Schiffovy báze izolované z několika druhů křínu (*Crinum*). Tato izolace dokazuje existenci Schiffových bází v přírodě a současně potvrzuje správnost hypotézy, ze které je odvozena celá biosyntéza¹².

Enzymatická příprava meziproductů

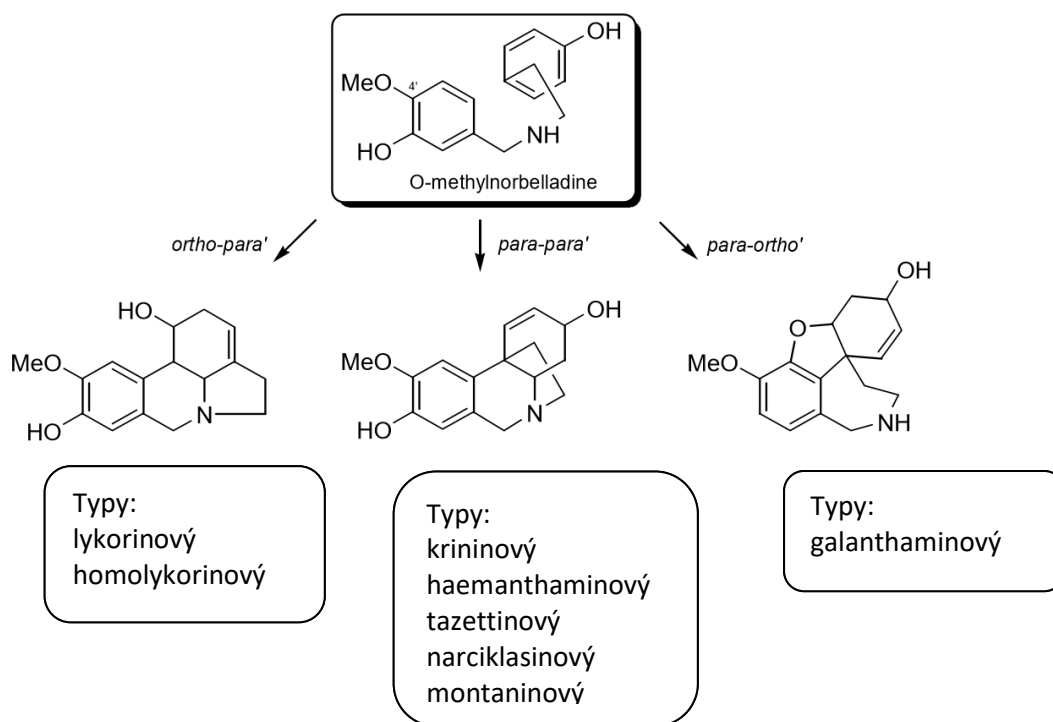
Norbelladin může podléhat oxidativnímu spojení, jakmile je kruh A chráněn methylocí. Tento krok je zcela zásadní pro vznik různých strukturních typů alkaloidů v této čeledi. Klíčovým meziproductem je ve většině případů *O*-methylnorbelladin¹² (**Obr. 2**).

Sekundární cyklizace a diferenciacce struktur

Tento krok probíhá na základě intramolekulárního oxidativního spojení *O*-methylnorbelladinu. Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení (*ortho-para'*, *para-ortho'*, *para-para'*) vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány podle svého hlavního reprezentanta. Jedná se o typy: lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), a α - a β -krinanový (krinin, haemanthamin). Biosyntetická cesta vedoucí k montaninovému strukturnímu typu (montanin) a dalším méně často se vyskytujícím typům nebyla doposud uspokojivě vysvětlena¹⁷. Mezi základní struktury těchto to alkaloidů je řazen také typ belladinový, který je odvozen od základního meziproductu celé biosyntézy⁴ (**Obr. 3**).



Obrázek 2: Biosyntéza norbelladinu¹²



Obrázek 3: Oxidativní spojení *O*-methylnorbelladinu¹²

3.1.4 Rod *Narcissus*

Do rodu *Narcissus* řadíme v závislosti na autorovi 50–180 botanických druhů s centrem diverzity na Pyrenejském poloostrově a v severní Africe. Narcisy představují rod taxonomicky složitý, zahrnuje řadu divokých druhů, kultivarů, mezidruhových hybridů a polyploidních forem^{18,19}. Proto je The Daffodil Society rozděluje do 13 divizí. Do poslední divize jsou řazeny rostliny, které jsou označeny výhradně botanickým názvem²⁰.

Tento rod přitahuje pozornost vědecké obce ze stejného důvodu jako celá čeleď amarylkovitých rostlin. Jedovaté a léčivé vlastnosti některých druhů vybízí k hledání biologicky aktivních látek. Jedná se o isochinolinové alkaloidy, jejichž obsah v cibulích kolísá mezi 1-2 %. Od izolace alkaloidu lykorinu roku 1877 bylo z různých druhů kultivarů tohoto rodu izolováno více než 100 sloučenin. Jednotlivé strukturní typy odpovídají výše popsaným strukturním typům amarylkovitých alkaloidů²¹. Jednotlivé strukturní typy jsou shrnuty v následující tabulce (**Tab. 1**).

Ve snaze odhalit vztahy mezi biosyntézou alkaloidů a fylogenetickým vývojem rostlin byly zkoumány alkaloidní profily 22 druhů narcisů a tří hybridů ze sedmi hlavních sekcí rodu *Narcissus*¹⁸ (ve své práci zachovávám původní anglické označení těchto sekcí).

V sekci „Nevadensis“ byl zkoumán alkaloidní obsah tří zástupců této sekce (*Narcissus segurensis*, *N. yepesii* a *N. alcaracensis*). Analýza hlavních komponent (*Principal Component Analysis*, PCA) ukázala, že alkaloidní obsah této sekce je poměrně podobný sekci „Pseudonarcissus“. Sekce „Nevadensis“ se vyznačuje přítomností lykorinového a homolykorinového strukturního typu alkaloidů, jako příklad lze uvést lykorin, galanthin a norpluviin¹⁸.

V rámci sekce „Pseudonarcissus“ byly řešeny alkaloidní profily sedmi druhů narcisů (*Narcissus salmanticensis*, *N. genesii-lopezii*, *N. radinganorum*, *N. muñozii-garmendiae*, *N. confusus*, *N. eugeniae* (dvě populace) a *N. perez-chiscanoi*). Dle převládající strukturního typu alkaloidů lze tyto druhy rozdělit do několika chemotypů: haemanthamin-tazettinové (*N. salmanticensis*), homolykorinové (> 74 % TIC, *N. genesii-lopezii*, *N. radinganorum*, a *N. muñozii-garmendiae*), homolykorin-galanthaminové (*N. confusus* a *N. eugeniae*), homolykorin-haemanthaminové (*N. perez-chiscanoi*). Tazettinový typ alkaloidů byl kromě *N. confusus* dále nalezen ještě v *N. salmanticensis* a *N. perez-chiscanoi*, nicméně poslední dva druhy byly PCA analýzou vyjmuty ze sekce Pseudonarcissus pro vysoký obsah alkaloidů typu haemanthaminu. Velice podobný obsah alkaloidů byl nalezen i v *N. genesii-lopezii*, *N. radinganorum*, *N. muñozii-garmendiae*, nicméně u nich převažuje homolykorin a 8-O-demethylhomomylykorin. Ačkoliv je tato sekce prostoupena alkaloidy homolykorinového typu, nebyl tento strukturní typ nalezen v *N. salmanticensis* ani v *N. asturiensis*. Dále byly u těchto dvou narcisů nalezeny alkaloidy haemanthaminového typu, proto byly PCA analýzou postaveny mimo tuto sekci. U druhu *N. eugeniae* byly studovány dvě populace, rostliny vykazovaly obdobné alkaloidní profily s určitou mezipopulační variabilitou. Zatímco u některých rostlin končí biosyntetická dráha syntézou pluviinu, tak u jiných se posunula směrem k homolykorinovému strukturnímu typu¹⁸.

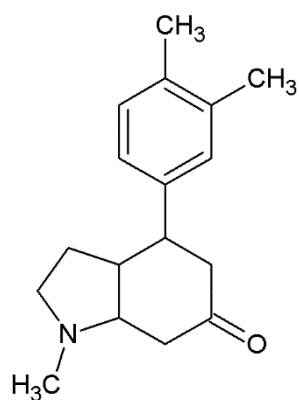
Ve čtyřech studovaných druzích narcisů sekce „Jonquillae“ (*Narcissus fernandesii* (dvě populace), *N. jonquilla* (tři populace), *N. viridiflorus* a *N. assoanus*) nebyly nalezeny žádné alkaloidy odpovídající homolykorinovému strukturnímu typu. *N. fernandesii* a *N. jonquilla* obsahují alkaloidy galanthaminového a tazettinového strukturního typu, ale pouze první z nich syntetizuje i značné množství alkaloidů lykorinového typu s převahou galanthinu. *N. viridiflorus* a *N. assoanus* vykazují odlišný typ biosyntézy. Zatímco pro *N. viridiflorus* jsou typické alkaloidy tazettinového strukturního typu se stopami galanthaminu, v *N. assoanus* nacházíme alkaloidy typu lykorinu¹⁸.

Dvě studované populace *N. tazetta* v rámci sekce „Tazettae“ vykazovaly odlišné alkaloidní profily. V populaci označované jako taz2 byly převážně tazettinový, narciklasinový a v listech lykorinový typ alkaloidů. Populace taz1 akumuluje sloučeniny typu homolykorinu a haemanthaminu¹⁸.

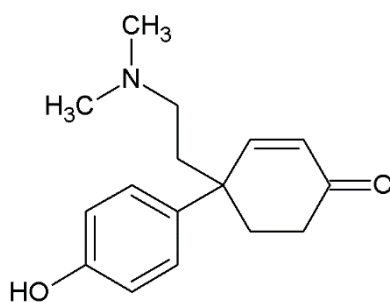
V sekci „Bulbocodium“ byly sledovány alkaloidní profily pěti druhů narcisů (*Narcissus cantabricus*, *N. hedraeanthus* (dvě populace), *N. conspicuus*, *N. subnivalis* (dvě populace) a *N. bulbocodium subsp. bulbocodium* (tři populace)) a dvou hybridů (*N. x neocarpetus* (*N. cantabricus* x *N. bulbocodium subsp. bulbocodium*) and *N. x litigosus* (*N. cantabricus* x *N. pallidulus*)). V cibulích narcisů nebyly detekovány žádné alkaloidy ani stopy alkaloidů, výjimkou je *N. cantabricus*, jehož cibule obsahují poměrně vysoké množství alkaloidů. V listech a květech se nachází velmi nízké množství alkaloidů, opět s výjimkou *N. cantabricus* a *N. hedraeanthus* (populace Hed1). Nadzemní části *N. hedraeanthus* obsahují alkaloidy haemanthaminového a lykorinového strukturního typu (populace hed1), zatímco druhá populace tohoto druhu (hed2) se vyznačuje přítomností alkaloidů typu tazettinu. *N. cantabricus* je charakterizován vysokou hladinou alkaloidů tazettinového typu a přítomností galanthindolu (indolový alkaloid). Mezidruhový hybrid *N. x neocarpetus* má podobný chemotyp jako *N. cantabricus*, zatímco v *N. x litigosus* byly detekovány alkaloidy tyraminového strukturního typu. Je zajímavé, že alkaloidní profil *N. bulbocodium subsp. bulbocodium*, *N. conspicuus* a *N. subnivalis* se vyznačuje tyraminovým strukturním typem protoalkaloidů (vedlejší produkty biosyntézy), zejména methyltyraminem a tyraminem. V této sekci byly dále nalezeny stopy lykorinového a homolykorinového strukturního typu alkaloidů¹⁸.

V rámci sekce „Ganymedes“ byl zkoumán obsah alkaloidů v *N. pallidulus*. Množství alkaloidů je vyšší v listech než v cibulích, v nichž je relativně nízký obsah alkaloidů. Jedná se o alkaloidy mesembranového typu, zejména o mesembrenon a mesembrenol¹⁸.

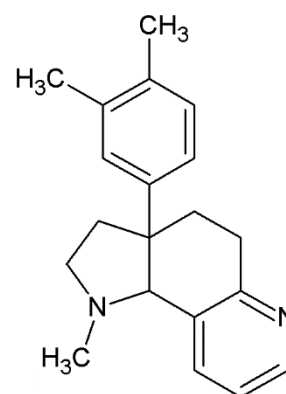
Alkaloidy mesembranového typu se běžně vyskytují v rodu *Sceletium*, který náleží do čeledi kosmatcovitých (Aizoaceae). Mesembranové alkaloidy jsou strukturně blízké krinanovému strukturním typu AAs, proto vědci předpokládali, že vznikají stejnou biosyntetickou cestou. Tato myšlenka se však nepotvrdila. Mesembranové alkaloidy lze rozdělit do tří podskupin, které jsou reprezentovány mesembrinem, joubertinaminem a skeletinem A4 (**Obr. 4**). Tyto látky působí jako inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, do budoucna by se teda daly využít jako antidepresiva nebo anxiolytika¹⁹.



Mesembrin



Joubertinamin



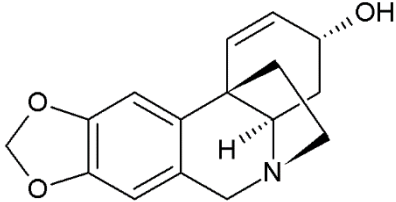
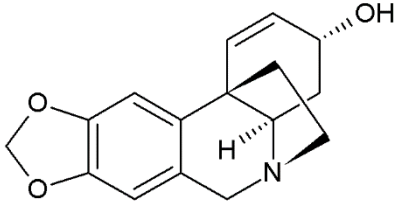
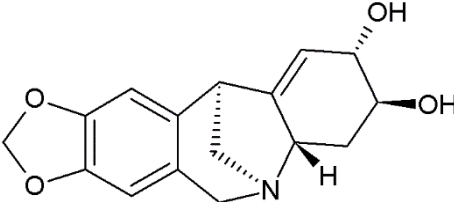
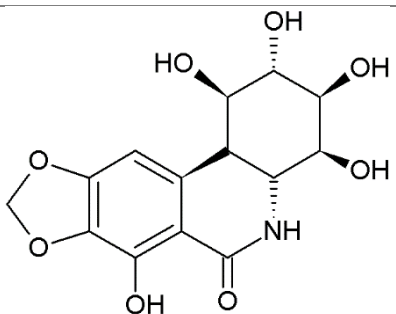
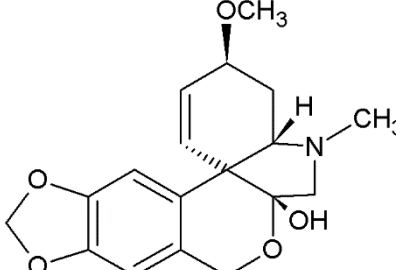
Skeletin A4

Obrázek 4: Alkaloidy mesembranového strukturního typu

Tabulka 1: Výskyt alkaloidů v rodech čeledi Amaryllidaceae a v rodu *Narcissus*

Strukturní typ (Zástupce)	Vzorec	Výskyt v rodu <i>Narcissus</i>	Výskyt v dalších rodech
Galanthaminový (Galanthamin)		<i>N. angustifolius</i> ²² <i>N. confusus</i> ²³ <i>N. jonquilla</i> ²⁴ <i>N. pseudonarcissus</i> cv. Carlton ^{25, 26}	<i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Zephyranthes</i>
Homolykorinový (Homolykorin)		<i>N. pseudonarcissus</i> cv. Carlton ^{25, 27} <i>N. tazetta</i> var. <i>chinensis</i> ²⁸ <i>N. brusseleti</i> ²⁹	<i>Clivia</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i>
Lykorinový (Lykorin)		<i>N. poeticus</i> ³⁴ <i>N. bujei</i> ³⁰	<i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Zephyranthes</i>

Tabulka 1: Výskyt alkaloidů v rodech čeledi Amaryllidaceae a v rodu *Narcissus* (pokračování)

Strukturní typ (Zástupce)	Vzorec	Výskyt v rodu <i>Narcissus</i>	Výskyt v dalších rodech
Krininový (Krinin)		<i>N. bujei</i> ³⁰ <i>N. catanbricus</i> ³¹ <i>N. tilifolia</i> ³²	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i>
Krininový (Haemanthamin)		<i>N. confusus</i> ²³ <i>N. tazetta</i> ³³ <i>N. triandrus</i> cv. <i>Thalia</i> ²⁴	<i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>
Montaninový (Pankracin)		<i>N. angustifolius</i> subsp. <i>transcarpaticus</i> ²²	<i>Hippeastrum</i> <i>Lycoris</i> <i>Pancreatum</i> <i>Scadoxus</i>
Pankratistatinový (Pankratistatin)		<i>N. cv. Ice Follies</i> ³⁵	<i>Boophane</i> <i>Haemanthus</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Pancreatum</i> <i>Zephyranthes</i>
Tazettinový (Tazettin)		<i>N. bujei</i> ³⁰ <i>N. catanbricus</i> ³¹ <i>N. tazetta</i> var. <i>chinensis</i> ²⁸	<i>Clivia</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i>

V rostlinách můžeme nalézt i sloučeniny nealkaloidní povahy jako např. flavonoidy, chalkony, lignany či triterpeny. O tom, že i nealkaloidní sloučeniny tohoto rodu mohou být zajímavé, svědčí například studie provedená s látkami izolovanými z *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. V rámci studie byly izolovány dva nové flavanové deriváty (tazettony C-D), beta-kumaranon (tazetton E), nový flavan (tazetton F) a nový fenyylpropanoid (tazetton G) a šest známých flavonoidů. Některé z nich vykazovaly zajímavou antioxidační aktivitu³⁶.

Další sloučeninou obsaženou v listech a stoncích narcisů je šťavelan vápenatý. Dříve se předpokládalo, že se rafidy vytvářejí spontánně. Je ale zřejmé, že tvorba tak složitých krystalů vyžaduje značnou míru genetické a biochemické kontroly.

Šťavelan vápenatý zastává dvě funkce. Reguluje hladinu vápníku v tkáních a zprostředkovává určitou formu ochrany před pasoucími se zvířaty a hmyzem, ale i před člověkem. Ekzematózní vyrážka s boláky označovaná v anglické literatuře jako daffodil picker's rash, dobře dokumentuje nebezpečnost této sloučeniny. Při řezu rostlin se rafidy dostanou do mízy, která vytéká z poraněných rostlin, v ní se pak rozpustí a působí toxicky. Při spasení interferuje šťavelan vápenatý s metabolismem vápníku některých zvířat²¹.

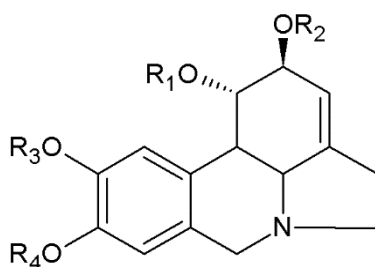
3.1.5 Hlavní představitelé jednotlivých strukturních typů amarylkovitých alkaloidů rostlin rodu *Narcissus* a jejich biologická aktivita

3.1.5.1 Lykorinový strukturní typ

Hlavním představitelem lykorinového strukturního typu je lykorin. Jedná se o pyrrollofenanthridinový cyklický alkaloid, jehož strukturu poprvé detailně popsal Nagakawa a spol. v roce 1956¹⁴.

Mezi další alkaloidy lykorinového strukturního typu patří např. pseudolykorin, karantin nebo pluviin¹⁵ (**Tab. 2**). Lykorin se vyznačuje širokým spektrem biologických aktivit. Inhibuje syntézu kyseliny askorbové, konkrétně inhibuje aktivitu L-galaktono- γ -lakton-dehydrogenázy, což je terminální enzym, který mění L-galaktono- γ -lakton na askorbát³⁷.

Tabulka 2: Amarylkovité alkaloidy lykorinového strukturního typu¹⁵



Název alkaloidu	Struktura			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Lykorin	H	OH	-CH ₂ -	
Pseudolykorin	H	OH	H	CH ₃
Galanthin	H	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
Karanin	H	H	-CH ₂ -	
Pluviin	H	H	CH ₃	CH ₃

Vykazuje selektivní antivirotické účinky na HIV-1 virus, SARS-asociovaný coronavirus (SARS-CoV), na poliovirus, flavivirus, virus ptačí chřipky (H5N1) a vaccinia virus pravých neštovic. Tato antivirotická aktivita je vysvětlována zablokováním DNA-polymerázy, čímž dochází k narušení celé proteosyntézy^{12, 38}.

Deriváty lykorinu vykazují zajímavou aktivitu na *Trichomonas vaginalis*, nejběžnější neviróvou pohlavně přenosnou nemoc, která způsobuje vaginitidy u žen a uretritidy u mužů. Další deriváty jsou slibné z hlediska svých antimalarických účinků, což je vzhledem k narůstající rezistenci rodu *Plasmodium* na běžná léčiva typu chlorochinu velmi významné¹².

Mnohé preklinické studie, které se zaměřují na výzkum lidské rakoviny, se zabírají lykorinem, protože vykazuje cytotoxicitu i na buněčné linie rezistentní k apoptóze¹³.

Cytotoxicita byla prokázána *in vivo* u myšního melanomu BL6 a Lewisova plicního karcinomu a také *in vitro* na HeLa buňkách a mnoha dalších typech nádorových buněk jako jsou CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ. Další testy byly provedeny na p53-negativní linii lidských leukemických promyelocytů HL-60 *in vitro* a na buňkách lidského mnohočetného myelomu (KM-3). Současné poznatky o apoptickém působení lykorinu lze shrnout takto. Lykorin indukuje apoptózu vnitřní mitochondriální cestou, kdy dochází k „down“ regulaci proteinu

Mcl-1 u nádorových buněk K562, U937 a HL-60¹⁴. Cytotoxické působení lykorinu shrnuje tabulka (Tab. 3).

Tabulka 3: Cytotoxická aktivita lykorinu¹⁴

Typ nádoru	Buněčná linie	IC ₅₀ (μM) ¹⁹
Leukemie	HL-60	1
	K562	1,25
	U937	2,42
Adenokarcinom prsu	MCF-7	13,0 ± 2,9
Melanom	G-361	5,0 ± 0,3

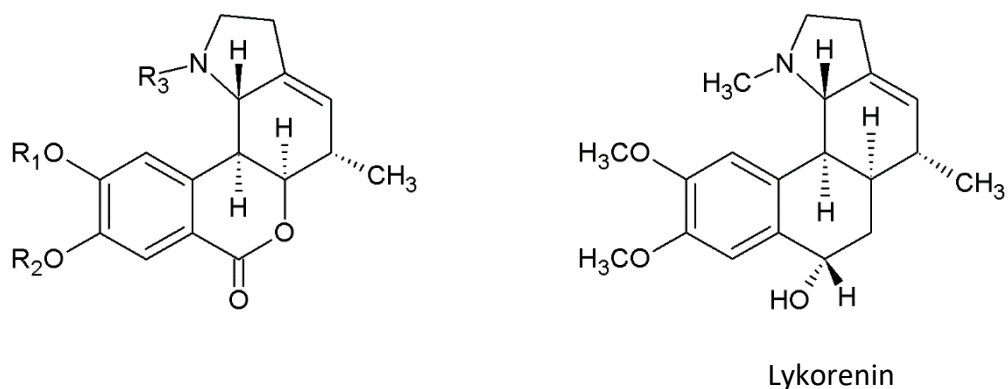
Lykorin nevykazuje výraznou inhibiční aktivitu na acetylcholinesterázu (AChE). Mnohem účinnější jsou některé jeho deriváty a další zástupci této skupiny. Aktivním zástupcem je assoanin s inhibiční aktivitou vůči AChE IC₅₀ = 3,87 μM. 1-*O*-Acetyllykorin je literaturou označován jako jeden z neúčinnějších inhibitorů AChE¹³. Nicméně na našem pracovišti byly získány rozporuplné výsledky. Při dřívějších experimentech byly získány hodnoty IC₅₀ = 0,96 ± 0,04 μM, zatímco při posledním experimentu se alkaloid jevil jako inaktivní (IC₅₀ > 1000 μM). Vzhledem k rozporuplným výsledkům byly provedeny stejně experimenty s komerčně dostupným acetylcholinesterázami z úhoře je srovnání předešlých hodnot IC₅₀ s předešlými daty. Při těchto experimentech vykazoval 1-*O*-acetyllykorin slabou inhibiční aktivitu vůči úhoří acetylcholinesteráze (IC₅₀ = 28,40 ± 0,35 μM), ale ve srovnání s původními publikovanými daty je inhibiční potenciál této látky mnohem nižší. Stejná situace byla popsána u isochinolinového alkaloidu protopinu. U lidské AChE byl neaktivní (IC₅₀ = 423 ± 10 μM), kdežto u acetylcholinesterázy z úhoře byla zjištěna inhibiční aktivita (IC₅₀ = 16,1 μM). Zdá se, že zdroj enzymu může v některých případech zásadně ovlivnit aktivitu testované sloučeniny. Ze získaných údajů lze usuzovat, že 1-*O*-acetyllykorin působí smíšeným mechanismem účinku³⁹. Některé další synteticky připravené deriváty lykorinu vykazují i aktivitu vůči BuChE (butyrylcholinesteráza). Lykorin-2-on je dokonce aktinější vůči BuChE než vůči AChE¹³.

3.1.5.2 Homolykorinový strukturní typ

Homolykorin a další alkaloidy homolykorinového strukturního typu jsou odvozeny od benzopyrano-indolu. Příklady sloučenin homolykorinového strukturního typu jsou shrnuty v tabulce (**Tab. 4**). Homolykorin vykazuje silnou antiretrovirovou aktivitu, zatímco hippeastrin je účinný na *Herpes simplex virus* typu 1⁴⁰.

Strukturně zajímavou sloučeninou je narseronin. Jedná se o první případ dvojně vazby mezi uhlíky C1 a C10b ve struktuře homolykorinového typu. Tato dvojná vazba uděluje cyklům A a B jistou rigiditu, konjugovaný systém dvojných vazeb pak přispívá ke stabilizaci molekuly. Mohlo by se jednat o novou charakteristiku farmakoforu s antifungální aktivitou. Této myšlence nasvědčuje skutečnost, že strukturně velmi blízký hippeastrin antifungálně působí na kvasinku *Candida albicans*⁴¹.

Tabulka 4: Amarylkovité alkaloidy homolykorinového strukturního typu¹⁵

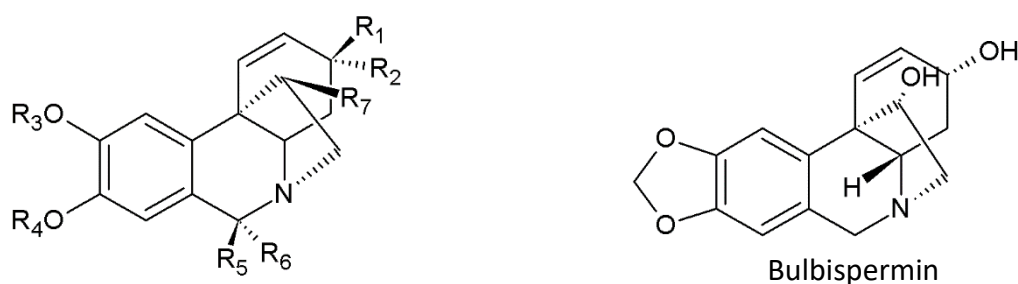


Název alkaloidu	Struktura		
	R1	R2	R3
Homolykorin	CH ₃	CH ₃	H
Masonin	-CH ₂ -		H
Hippeastrin	-CH ₂ -		OH

3.1.5.3 Krininový a haemanthaminový strukturní typ

Tento typ alkaloidů je strukturně odvozen od 5,10*b*-ethanophenanthridinu. Jako příklad lze uvést haemanthamin, haemanthidine a krinamin¹³, jejichž struktury jsou uvedeny v následující tabulce (**Tab. 5**).

Tabulka 5: Amarylkovité alkaloidy haemanthaminového strukturního typu¹⁵



Název alkaloidu	Struktura						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Krinamin	H	OCH ₃	-CH ₂ -		H	H	OH
Haemanthamin	OCH ₃	H	-CH ₂ -		H	H	OH
Haemanthidin	OCH ₃	H	-CH ₂ -		H	OH	OH
Papyramin	OCH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	OH	H
Vittatin	OH	H	-CH ₂ -		H	H	H

Sloučeniny nesoucí tyto strukturní znaky účinně inhibují proliferaci nádorových buněk, které jsou rezistentní vůči proapoptickým stimulům. Hovoříme o nádorech refrakterních k současné chemoterapii, konkrétně jde o buněčné linie gliomu, melanomu a dále o některé nádory jícnu, hlavy a krku⁴².

Ve studii vykazoval bulbispermin cytotoxickou účinnost na buňky gliomu rezistentního k apoptóze. Za cytotoxické působení musí být tedy zodpovědný jiný mechanismus účinku než indukce programované buněčné smrti. Zjistilo se, že bulbispermin a deriváty tohoto strukturního typu zvyšují rigiditu aktinu v cytoskeletu nádorových buněk⁴³.

Na základě tohoto objevu byla synteticky připravena celá řada derivátů, odvozených od 5,10*b*-ethanophenanthridinu, jejichž účinnost byla testována na vybraných buněčných liniích. Dalším pozitivním poznatkem je, že u zdravých linií buněk je nutná 5-10x vyšší dávka, aby byla indukována apoptóza⁴².

Studie provedená u nás na fakultě se zabývala cytotoxickým potenciálem izolovaných AAs na dvě linie buněk kolorektálního adenokarcinomu s mutací p53. Nejlepší výsledky byly získány pro alkaloidy haemanthamin, haemanthidin a lykorin⁴ (**Tab. 6**).

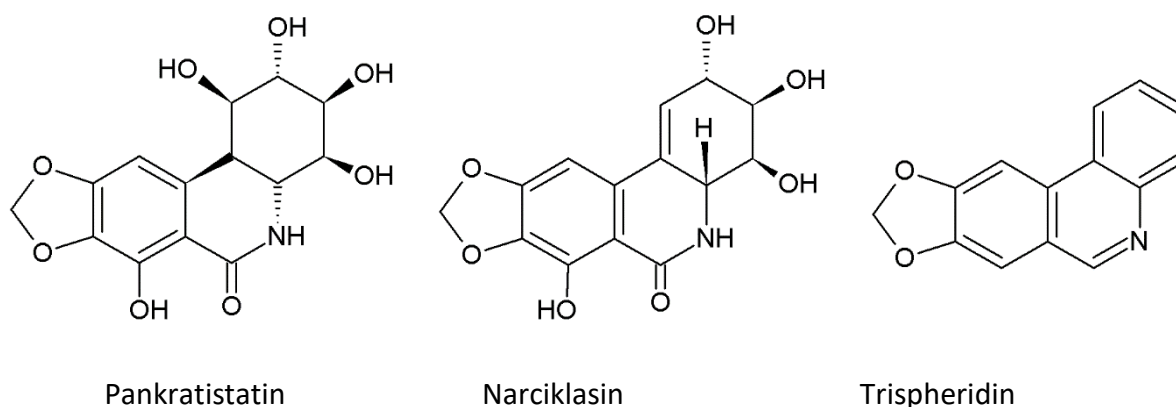
Tabulka 6: Cytotoxicita testovaných struktur vůči 2 liniím nádorových buněk v porovnání s linií zdravých buněk⁴⁴

Sloučenina	Rakovinné buňky		Normální buňky
	Caco-2 IC ₅₀ (μM)	HT-29 IC ₅₀ (μM)	FHs 74 Int IC ₅₀ (μM)
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Haemanthidin	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,1	11,6 ± 0,9
Lykorin	0,99 ± 0,08	1,2 ± 0,0	22,7 ± 0,1
Vinorelbin	0,03 ± 0,00	NT	4,0 ± 0,3

NT- netestováno

3.1.5.4 Pankratistatinový strukturní typ

Strukturní základ tohoto typu alkaloidů představuje fenantridin¹². K alkaloidům tohoto strukturního typu řadíme dále například pankratistatinu, narciklasin a trisphaeridin²¹ (**Obr. 5**).



Obrázek 5: Příklady alkaloidů pankratistatinového strukturního typu

Hlavním zástupcem tohoto strukturního typu je pankratistatin. Pankratistatin významně snižuje životaschopnost buněčných linií karcinomu prostaty LNCaP a DU145, dopad na lidské fibroblasty NHF při účinných koncentracích je zanedbatelný. Za zmínku stojí také potlačení migrační kapacity těchto nádorových buněk⁴⁵.

Současná chemoterapeutika indukují apoptózu nádorových buněk prostřednictvím p53. Většina karcinomů má ale tento protein mutantní či inaktivovaný. Cytotoxicita pankratistatinu byla studována na liniích kolorektálního karcinomu p53-mutovaných HT-29 a p53-wilde type HCT116 a porovnána se zdravými fibroblasty střeva CCD-18Co. Tyto testy potvrzují

předpoklad, že pankratistatin nepůsobí apopticky přes p53, vyvolává apoptózu poklesem mitochondriálního membránového potenciálu⁴⁶.

Dalším zástupcem tohoto strukturního typu je narciklasin. Narciklasin se stal předmětem mnoha výzkumů kvůli své protinádorové aktivitě. Inhibuje růst buněk zablokováním proteosyntézy, vazebné místo se nachází na ribosomální podjednotce 60S. Tyto účinky vykazuje i řada jeho synteticky připravených derivátů⁴⁷ (**Tab. 7**).

Tabulka 7: Protinádorová aktivita narciklasinu a jeho derivátů⁴⁷

Sloučenina	GI ₅₀ (μM)	Srovnávací korelační koeficient
Narciklasin	0,016	0,90
Trans-dihydronarciklasin	0,013	0,92
Pankratistatin	0091	1
Cis-dihydronarciklasin	3, 8	< 0,6

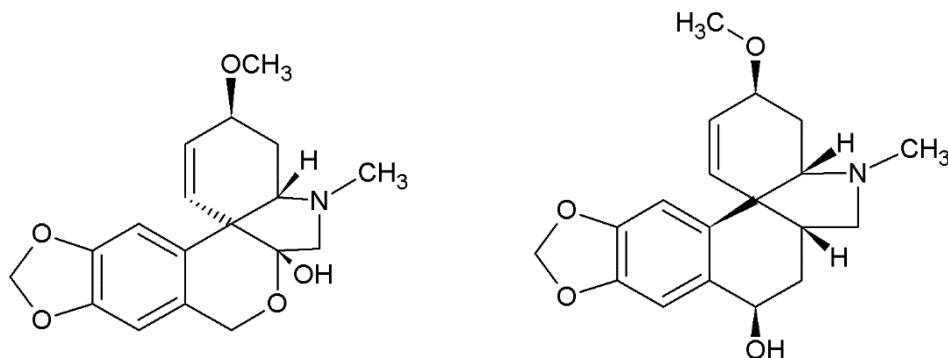
Narcistatin (cyklický fosfát, proléčivo narciklasinu) snižuje zánět (cca o 50 %) a s ním spojenou destrukci kloubu (cca o 70 %) v krysím artritickém modelu. Snižuje produkci prozánětlivých cytokinů v různých typech leukocytů. Tyto účinky byly pozorovány i u extraktu izolovaného z *Haemanthus coccineus*. Extrakt blokoval aktivaci leukocytů a endotelových buněk. Je pozoruhodné, že nebyl zjištěn inhibiční efekt na prozánětlivý transkripční faktor NFκB, ale byla pozorována silná inhibice genové transkripce, která je závislá právě na tomto faktoru. Přesný mechanismus účinku není doposud popsán⁴⁸.

3.1.5.5 Tazettinový strukturní typ

Tento typ zahrnuje alkaloidy odvozené od 2-benzopyrano[3,4-c]indolu¹². Hlavním představitelem skupiny je tazettin, jeden z nejběžnějších alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Prakticky vzato není přirozeně se vyskytujícím alkaloidem, ale pozůstatkem chemicky labilního prekurzoru pretazettinu. Biologická aktivita tohoto prekurzoru je mnohem zajímavější než aktivita tazettinu⁴⁹ (**Obr. 6**).

Tazettin vykazuje slabou aktivitu proti některým liniím nádorových buněk, byl také popsán slabý hypotenzní a antimalarický efekt⁴⁹.

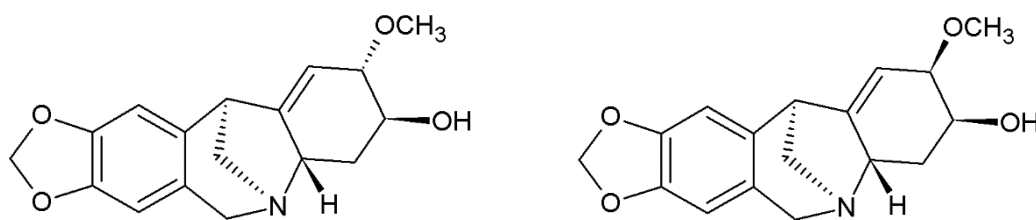
Pretazettin působí cytotoxicky na fibroblastické linie LMTK, buněčné linie Raucherovy leukémie a Lewisův plicní karcinom. Inhibuje růst HeLa buněk. Patří mezi nejaktivnější alkaloidy účinné na T-lymfoidní buňky MOLT-4⁵⁰. Pretazettin inhibuje aktivitu P-glykoproteinu, zvyšuje aktivitu doxorubicinu u rezistentních forem myších leukemií. Váže se na enzym reverzní transkriptázu u rozdílných typů onkogenních virů, dále je účinný proti Herpes simplex viru a flavivirům. Dřívější práce rovněž popisují inhibici proteosyntézy eukaryotických buněk potlačením tvorby peptidové vazby¹⁴.



Obrázek 6: Vzorec tazettinu a pretazettinu

3.1.5.6 Montaninový strukturní typ

Hlavním představitelem této skupiny látek je montanin (**Obr. 7**). Montanin byl v rámci celé řady studií testován na široké spektrum biologických aktivit. Jedna ze studií vychází z poznatku, že většina AAs inhibuje AChE, což bylo inspirací ke studiím dalších neurofarmakologických aktivit⁵¹.



Obrázek 7: Vzorce montaninu a kokcininu

Byly zjištěny účinky sedativní, anxiolytické, antikonvulzivní, snížení pohybové aktivity a určitý antidepresivní potenciál látky. Sedativní účinky popsány jako zkrácení doby pro usnutí a prodloužení doby spánku vyvolaného pentobarbitalem lze vysvětlit dvěma způsoby. Buď montanin zasahuje do regulace spánku, nebo inhibuje metabolismus pentobarbitalu. Dle

studie lze anxiolytický efekt vysvětlit vazbou na vazebná místa benzodiazepinů na GABA_A receptoru⁵¹.

Studie provedená na extraktech rostlin *Haemanthus coccineus*, *Haemanthus montanus* a *Haemanthus sanguineus* se zabývala afinitou extraktu a následně jednotlivých alkaloidů (montaninu a kokcininu) k SERT (serotonin transporter). Sumární extrakty těchto rostlin vykazovaly zajímavou afinitu vůči proteinu, ale jednotlivé alkaloidy měly afinitu nižší. Možný synergický efekt montaninu a kokcininu byl v rámci studie vyvrácen. Předpokládá se, že za účinek jsou zodpovědné jiné minoritní složky extraktu⁵².

Montanin působí cytotoxicky na některé linie nádorových buněk (**Tab. 8**). Mechanismus účinku doposud nebyl studován⁵³.

Tabulka 8: Cytotoxická aktivita dvou typů extraktů (CH₂Cl₂, n-butanolu) a alkaloidu montaninu izolovaného z *Hippeastrum vittatum*⁵³

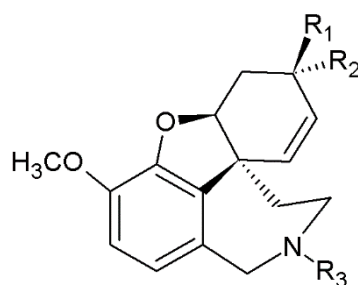
Vzorek	Buněčná linie				
	HT29	H460	RXF393	MCF7	OVCAR3
CH ₂ Cl ₂	0,68 ± 0,21	0,62 ± 0,06	0,79 ± 0,52	1,60 ± 0,34	0,84 ± 0,29
n-Butanol	4,08 ± 0,61	3,34 ± 0,30	2,93 ± 0,6	3,74 ± 0,29	3,56 ± 0,25
Montanin	0,71 ± 0,10	0,57 ± 0,57	0,65 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,84 ± 0,11

Dalším zástupcem tohoto strukturního typu je pankracin. Byly u něj popsány antiprotozoální a antibakteriální účinky. Byla zjištěna slabá aktivita proti prvokům *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* a proti dvěma kmenům *Plasmodium falciparum*²². Jiná studie popsala antibakteriální účinky na bakterie *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁴.

3.1.5.7 Galanthaminový strukturní typ

Jedná se o alkaloidy, jejichž strukturním základem je dibenzofuranové jádro¹². Vzhledem k povaze diplomové práce bude galanthamin, hlavní zástupce skupiny, podrobněji probrán v následující kapitole. Jako další zástupce tohoto strukturního typu lze uvést norgalanthamin, epigalanthamin, narcisin, narwedín a lykoramin¹⁵ (**Tab. 9**). Nejvýraznější biologickou aktivitou galanthaminu a celé skupiny je inhibice AChE a BuChE¹².

Tabulka 9: Amarylkovité alkaloidy galanthaminového strukturního typu¹⁵



Název alkaloidu	Struktura		
	R1	R2	R3
Galanthamin	OH	H	CH ₃
Epigalanthamin	H	OH	CH ₃
Norgalanthamin	OH	H	H
Narcisin	OH	H	Ac
Narwedín		-O-	CH ₃
Lykoramin	OH	H	CH ₃

Obecně lze říci, že nejvyšší inhibiční aktivitu na AChE vykazuje galanthaminový a lykorinový strukturní typ. Aktivita těchto alkaloidů je porovnávána s aktivitou galanthaminu. Galanthamin svojí aktivitou ($IC_{50} = 1,5 \pm 0,2 \mu M$) na AChE převyšuje většinu AAs¹³.

Mezi alkaloidy galanthaminového typu vykazující vyšší inhibiční efekt na AChE patří sanguinin ($IC_{50} = 0,1 \pm 0,01 \mu M$), tento 9-hydroxy derivát je asi 10x aktivnější než galanthamin¹³. Je obsažen v cibulích rostlin *Eucharis grandiflora* (libenka velkokvětá) a *Galanthus nivalis* (sněžěnka podsněžník). Vzhledem k tomu, že se vyskytuje jen ve stopových množstvích, byl izolován mnohem později než galanthamin a jeho vlastnosti jsou intenzivně zkoumány až v posledních letech⁵⁵. Zdá se, že pro účinnost je zásadní hydroxylová skupina v poloze R1 a způsob její substituce. Tento inhibiční efekt sanguininu přinesl hypotézu o vazebném mechanismu mezi galanthaminem a AChE, může být odrazovým můstkem pro přípravu derivátů galanthaminu¹³.

Narwedín je biosyntetickým prekurzorem galanthaminu. Byl studován jako stimulátor dechu¹². Zvyšuje amplitudu a frekvenci dýchacích pohybů. Dále má negativně chronotropní efekt na srdeční sval, vykazuje hypotenzní účinek. Bylo popsáno, že snižuje sedativní účinky

alkoholu a barbiturátů, naopak zvyšuje analgetický účinek morfinu a stejně tak zvyšuje efekt kofeinu, arekolinu či nikotinu¹⁵.

3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které se klinicky prezentuje syndromem demence⁵⁶. Demence je syndrom, který vzniká následkem chronického nebo progresivního onemocnění mozku, u něhož dochází k narušení mnoha vyšších korových funkcí jako paměti, myšlení, orientace, chápání, uvažování, schopnosti učení, řeči a úsudku⁵⁷. Podle odhadů České alzheimerovské společnosti žije v České republice 150000 lidí s demencí. Jen část z nich je správně diagnostikována a léčena. Asi 60 % všech demencí je způsobeno Alzheimerovou chorobou (AD)⁵⁸. Příčina zatím není přesně známa a stejně tak není znám účinný lék. Léčba se zaměřuje zejména na zlepšení kognitivních schopností mozku⁵⁵.

Pro AD je typický plíživý, pomalý začátek. Rozlišení prvních poruch paměti od příznaků, které mohou doprovázet normální stárnutí, nemusí být zpočátku jednoduché. Příznaky AD se v průběhu času zhoršují. Člověk trpící AD žije průměrně 4-8 let od stanovení diagnózy. Může žít i déle, vždy záleží na okolnostech. Pacienti umírají na interkurentní choroby, selhání životních funkcí, někdy i na následky úrazů. Chorobu lze rozdělit do tří stádií, která korespondují se zhoršováním příznaků. Jednotlivá stádia se mohou překrývat^{60, 61}. Současně s demencí se postupně rozvíjejí nekognitivní poruchy behaviorální a psychologické (BPSD-Behavioral and Psychological Symptoms in Dementia). Mezi tyto poruchy řadíme stavy apatie, agitace, poruchy stravování (změny v chutích, anorexie, bulimie), agresivitu (verbální, fyzická), toulání (po bytě/domě ale i mimo něj), vokalizaci, sexuální desinhibici, afektivní poruchy (anxieta, deprese, mánie), poruchy vnímání (halucinace, iluze) a poruchy myšlení (bludy)⁵². Obvyklým příznakem jsou i poruchy cyklu spánku a bdění. S postupujícím onemocněním vyžadují nemocní stále vyšší míru péče^{60, 61}.

3.2.1 Patofyziologie Alzheimerovy nemoci

V případě AD hovoříme o onemocnění s velmi komplexní patofyziologií, která nebyla doposud zcela objasněna. Výzkumy minulých let poskytly důležité stavební kameny pro formulaci teorie tohoto procesu, která slouží k rozvoji nových inovativních konceptů léčby⁶².

3.2.1.1 Amyloidní hypotéza

Za klíčový patogenetický faktor při vzniku AD je považován beta-amyloid ($A\beta$). $A\beta$ je produktem proteolytického štěpení transmembránového vysokomolekulárního proteinu APP (amyloid precursor protein). Za toto štěpení jsou zodpovědné enzymy α -, β -, γ -sekretasa⁶³. Za fyziologických podmínek je APP štěpen α -sekretasou, dochází k uvolnění solubilních fragmentů s koncovou aminokyselinovou doménou sAPP α (solubilní APP po štěpení α -sekretasou) a fragmentu CTF (C-terminální fragment). Tento enzym brání produkci $A\beta$, proto se dráha označuje jako neamyloidogenní^{64, 65}.

Amyloidogenní dráha je katalyzována β -sekretasou (beta site APP cleaving enzyme, BACE). Po štěpení BACE jsou opět generovány fragmenty s terminální aminokyselinovou doménou sAPP β (solubilní APP po štěpení β -sekretasou) a fragment b-CTF (C-terminální fragment po štěpení β -sekretasou). Následuje ještě jedno štěpení prostřednictvím γ -sekretasy, která štěpí b-CTF v pozici 40. nebo 42. aminokyseliny a vzniká amyloid- β 40 nebo amyloid- β 42. Přibližně 90 % reziduí tvoří $A\beta$ 40. Problémem však je mnohem toxičtější, vysoce agregabilní forma $A\beta$ 42 a současně nejčastější izoforma nalézaná v senilních placích^{64, 65}.

Alois Alzheimer popsal $A\beta$ jako protein, který se ukládá extracelulárně v neuronální tkáni a vede ke vzniku tzv. senilních plaků. Sekundárně dochází k zánětlivým a oxidativním procesům a ireverzibilnímu poškození tkáně. $A\beta$ se neukládá jen v extracelulárních prostorech šedé hmoty mozkové, ale postihuje i mozkové cévy. Ukládání $A\beta$ v cévách se označuje jako cerebrální amyloidní angiopatie (CAA). Proces způsobuje endoteliální dysfunkci a produkci volných radikálů. V konečném důsledku by mohlo dojít k chronické hypoperfúzi některých částí mozku rezultující v cerebrovaskulární dysfunkci, ztrátu neuronů a degeneraci^{64, 65}.

V současnosti je věnována zvýšená pozornost rozpustným formám $A\beta$ (tzv. $A\beta$ -derived diffusible ligands, ADDL). Předpokládá se, že jsou zodpovědné za zhoršení přenosu informací a synaptické plasticity. Tyto formy $A\beta$ se objevují v časných stádiích AD, kdy ještě nedochází k tvorbě senilních plaků. Opakovaně byly nalezeny v mozkových strukturách zodpovědných za tvorbu paměti, například v hippocampu. Tímto způsobem by se daly vysvětlit poruchy paměti na molekulární úrovni⁶³.

3.2.1.2 Tau hypotéza

I když hraje $A\beta$ významnou roli v patofyziologii AD, amyloidní hypotéza nevysvětluje uspokojivě všechny skutečnosti. To, že zatížení senilními plaky dost dobře nekoreluje s kognitivními funkcemi ani s postupem onemocnění, je největší trhlinou celé teorie. Poruše kognitivních funkcí mnohem lépe odpovídá přítomnost intracelulárních neurofibrilárních uzlíků (neurofibrillary tangles, NFT). Jedná se o struktury tvořené spárovanými helikálními vlákny fosforylovaného tau-proteinu. Tau-protein má i fyziologickou funkci, zodpovídá za zesíťování mikrotubulů a stabilizaci cytoskeletu neuronů. Fosforylace tau-proteinu vede k disociaci mikrotubulárního systému a destabilizaci cytoskeletu^{62, 64}.

3.2.1.3 Cholinerní hypotéza

Kromě amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek je jedním z hlavních patofyziologických znaků AD progredující ztráta cholinerních neuronů a jejich kortikálních projekcí z nucleus basalis a oblastí přilehlých bazálnímu přednímu mozku⁶⁵. U Alzheimerovy nemoci, ale i u jiných demencí dochází k progredující ztrátě cholinerních neuronů v nucleus basalis Meynerti. Dochází zde k postižení všech částí cholinerního systému. To zahrnuje snížení hladin acetylcholinu (ACh) a cholinacetyl transferázy, pomocí které je ACh syntetizován. Také klesá hladina AChE, pomocí které je ACh odbouráván po vyloučení do synaptické štěrbině⁶⁶. Zajímavé je, že hladina dalšího enzymu odbourávajícího ACh, BuChE při AD progresivně a významně stoupá. Tyto děje přispívají ke zhoršení cholinerní neurotransmise⁶⁵.

Cholinesterázy představují rodinu enzymů, která katalyzuje hydrolýzu ACh na cholin a acetát, čímž umožňují návrat cholinerního neuronu do klidového stavu. Acetylcholinesteráza (AChE) byla nalezena ve svalech, motorických a senzorických nervových vláknech, ale i v membráně červených krvinek⁶⁷. AChE existuje ve třech globulárních formách obsahující jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky (monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4). G1 AChE existuje výhradně jako rozpustná entita, zatímco G4 AChE existuje jak v rozpustné, tak v membránově vázané formě. V lidském mozku se AChE vyskytuje v G1 a G4 formě, přičemž se jejich poměr v různých oblastech mozku liší⁶⁵. Butyrylcholinesteráza (pseudocholinesteráza, BuChE) se nachází především v játrech⁶⁷. BuChE se také vyskytuje ve více molekulárních formách, ale ve zralém mozku je převládající izoformou G4. V průběhu AD vykazuje izoforma G1 30–60 % zvýšení, zatímco hladina G4 formy klesá nebo zůstává stejná jako v normálním mozku⁶⁵.

Strukturní vlastnosti těchto dvou cholinesteráz určují rozdíly v jejich substrátové specifitě. AChE je vysoce selektivní pro hydrolýzu ACh, zatímco BuChE je schopna metabolizovat několik různých molekul. Současné poznatky naznačují, že v normálním mozku je AChE hlavním enzymem zodpovědným za hydrolýzu ACh, zatímco BuChE má funkci podpůrnou⁶⁵.

3.2.1.4 Glutamátergní hypotéza

Glutamát představuje hlavní excitační neurotransmitter. Přenos signálu přes glutamátové receptory je složitý, glutamát působí na ionotropní i metabotropní receptory. Stimulace metabotropních receptorů vede ke změnám intracelulárních signálních drah, zatímco aktivace ionotropních receptorů otevírá iontové kanály a následně depolarizuje neuronální membránu. Různá afinita ligandů k ionotropním receptorům vedla k jejich rozdělení na tři hlavní subtypy: N-methyl-D-aspartátový (NMDA), kainátový a α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátový (AMPA) receptor. AMPA a kainátový receptor umožňují influx sodných kationtů do buňky. Pro patofyziologii AD jsou nejvýznamnější receptory NMDA, jejichž aktivace vede ke vstupu vápenatých kationtů do buňky⁶⁸. Stimulace NMDA receptorů je pro dlouhodobou potenciaci (long-term potentiation) esenciální, jde o jakousi buněčnou analogii učení⁶⁹.

Glutamátergní systém je postižen v těžších stádiích Alzheimerovy choroby. Dochází k excitotoxicitě, tzn. k nadměrnému uvolňování glutamátu a také ke snížení zpětného vychytávání glutamátu v některých oblastech mozku významných pro paměť. Nadměrný vstup kalcia do neuronů má za následek aktivaci některých proteinkináz, zvýšenou expresi některých proapoptoticky působících látek a neuronální apoptózu^{70, 71}.

3.2.1.5 Oxidační stresová hypotéza

Oxidačním stresem se popisuje stav, kdy je porušena fyziologická rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů. Je do určité míry fyziologickým důsledkem řady biochemických a bioenergetických pochodů a doprovází aerobní organizmy po celý jejich život, podílí se na přirozeném stárnutí organismu. Volné radikály, které jsou v případě oxidačního stresu produkovány ve zvýšené míře, jsou schopny napadat všechny typy makromolekul, což ve svém důsledku může vést k poškození funkce buněk a tkání. Všechny výše popsané

hypotézy vysvětlující mechanismus vzniku AD jsou spojené s oxidativním stresem a rozvojem sterilního zánětu. Roli oxidačního stresu v patogenezi AD podporuje fakt, že neurony jsou postmitotické buňky, ve kterých se oxidační poškození kumuluje v průběhu celého života. To by vysvětlovalo pozvolně se rozvíjející charakter onemocnění i propuknutí až v pokročilém věku jedinců^{67, 72}.

3.2.1.6 Alzheimerova choroba jako diabetes mellitus 3. typu

Mozek dlouhou dobu nebyl počítán mezi orgány citlivé na působení inzulínu. Později však bylo zjištěno, že v řadě oblastí centrální nervové soustavy (CNS) lze prokázat inzulín i inzulínové receptory. Existují dva typy inzulínových receptorů: periferní typ, nacházející se na gliálních buňkách, a centrální neuron-specifický mozkový typ, který má zřejmě hlavní význam pro různé funkce mozku, jako je synaptická aktivita, potřebná pro učení a paměť. Podle řady autorů má klíčovou roli v patogenezi pozdní formy AD hyperinzulinémie, spojená s porušenou signální funkcí inzulínu v centrálním nervovém systému^{73, 74}.

V neuronech inzulín zvyšuje degradaci A β . Zvyšuje se také exprese inzulín-degradujícího enzymu (IDE), který vedle štěpení molekuly inzulínu štěpí také A β a intracelulární doménu fragmentu APP (intracellular domain fragment APP). Kompetice inzulínu a A β o IDE při zvýšené hladině inzulínu může přispívat ke zvýšené zátěži A β . Hyperinzulinémie vede také ke zvýšení aktivity enzymu glykogensyntázy-kinázy 3 beta (GSK3 β), tím zvyšuje fosforylaci proteinu tau a tvorbu patologických neurofibrilárních klubek. Porušená inzulínová signalizace je také spojena se zvýšením aktivity cdk5 (cyklin dependentní kinázy), enzymu, který se rovněž podílí na hyperfosforylaci tau. Naopak inhibice GSK3 β snižuje amyloidogenní štěpení APP a hyperfosforylaci tau. Dalším faktorem, působícím v patogenezi AD, je dysregulace metabolismu glukózy v mozku. Porucha glukózového metabolismu v mozku souvisí se zvýšenými hladinami AGEs (advanced glycation endproducts). Vazba AGEs na RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) vede mimo jiné k aktivaci signální kaskády jaderného transkripčního faktoru NF κ B. Dochází pak ke zvýšené transkripci genů pro řadu prozánětlivě působících enzymů a cytokinů, například inducibilní syntáza oxidu dusnatého (iNOS), cyklooxygenáza 2 (COX-2) či tumor nekrotizační faktor alfa (TNF α). Bylo zjištěno, že mezi ligandy RAGE patří i A β . Výsledkem těchto molekulárních dějů je zvýšený oxidační stres

a zánětlivý proces^{72, 73}. Vztah mezi AD a hyperinzulinémií, inzulinovou rezistencí a diabetem mellitem 2. typu byl prokázán v klinických studiích^{75,76}.

3.2.2 Terapie Alzheimerovy nemoci

3.2.2.1 Současná terapie AD

V současné době nejsme schopni onemocnění léčit kauzálně, protože neznáme přesnou etiologii onemocnění. Existuje léčba symptomatická, která cílí na známé patogenetické mechanismy. Tento způsob léčby nemoc nevyléčí, ale oddálí těžká stadia choroby. Využívají se dva terapeutické postupy, respektive dvě skupiny léčiv, jejichž použití vychází z medicíny založené na důkazech (evidence based medicine): inhibitory cholinesteráz a inhibitory NMDA receptorů^{57, 67}.

1. Inhibitory cholinesteráz

Mechanismus účinku a použití těchto léčiv vychází z cholinergní hypotézy. Inhibitory cholinesteráz jsou indikovány u lehkých a středně těžkých stádií AD. U nás, i ve většině zemí světa, jsou používány v současné době tři látky: donepezil, galanthamin a rivastigmin^{57, 67}.

Od inhibitorů cholinesteráz se očekává, že budou dobře procházet hematoencefalickou bariérou a ovlivňovat obě formy mozkových AChE. Léčiva by neměla působit na periferní formy AChE, aby nedocházelo k nežádoucím účinkům. Některé z inhibitorů inhibují i mozkové BuChE (takrin, rivastigmin). Způsob inhibice cholinesteráz je reverzibilní nebo pseudoireverzibilní. Reverzibilní inhibice trvá tak dlouho, jak dlouho je přítomna látka nebo její aktivní metabolit v plazmě. Pseudoireverzibilní inhibice trvá déle, než je přítomnost účinné látky v plazmě⁷⁷.

Léčba demence má dvě fáze – titrační (akutní, eskalační) a dlouhodobou (terapeutickou, udržovací). Obě fáze se liší výskytem a charakterem vedlejších účinků, čímž dochází k rozlišení inhibitorů AChE z hlediska snášenlivosti i bezpečnosti. Cílem první fáze je dosažení předpokládané základní terapeutické dávky. Základní titrační interval je 4 týdny. Rychlejší titrace dávky je spojena s akutními gastrointestinálními nežádoucími účinky, které jsou charakteristické pro celou skupinu inhibitorů AChE („class-effects“). Objevují se v důsledku rychlého vzestupu hladiny ACh, po kterém následuje kompenzační zvýšení hladiny dopaminu v area postrema. Výskyt nežádoucích účinků v akutní fázi léčby lze snížit jednak pozvolnou

titrací dávky nebo například podání s jídlem nebo krátce po jídle. Jakmile je dosaženo maximální účinné dávky, pokračuje se s udržovací fází léčby. Nežádoucí účinky v dlouhodobé fázi jsou odlišné pro jednotlivé inhibitory cholinesteráz („non-class related“). Odlišení je způsobeno tím, že se na jejich výskytu uplatňuje kromě centrální i periferní cholinergní aktivita, významný vliv má i blokáda jednotlivých izoform cholinesteráz^{58, 72, 78}.

Obsoletní sloučeniny

Takrin

Takrin je derivátem tetrahydroakridinu (**Obr. 8**). Takrin zvyšuje hladinu ACh, vede k down regulaci a aktivaci M1 muskarinových receptorů, blokuje M2 muskarinové receptory, zvyšuje počet nikotinových receptorů v mozku a zesiluje nervosvalový přenos⁷⁹. Takrin je centrální nekompetitivní reverzibilní inhibitor AChE a BuChE, silněji inhibuje BuChE⁸⁰. Jeho klinické účinky na AD jsou slabé, zlepšení kognice se projevuje u 20-30 % léčených pacientů po 3-6 měsících léčby. Navíc dle studie z roku 1994 dokončilo 30-týdenní léčbu takrinem 279 z 663 subjektů (42 %). Ostatní ze studie odstoupili buď kvůli gastrointestinálním nežádoucím účinkům nebo kvůli zvýšeným hladinám jaterních transamináz. Potřeba týdenního monitorování jaterních funkcí spolu s nutností užívat lék čtyřikrát denně činí z takrinu léčivo, které je v klinické praxi nepoužitelné⁸¹.

Klinicky užívané sloučeniny

Donepezil (Alzil[®], Apo-donepezil[®], Aricept[®], Donepezil Mylan[®], Donpethon[®], Yasnal[®])

Donepezil byl schválen FDA roku 1996 pod obchodním názvem Aricept na léčbu AD, roku 2006 byl schválen i na léčbu ostatních demencí⁸². Chemickou strukturou se řadí mezi piperidiny (**Obr. 8**). Je reverzibilním inhibitorem AChE, inhibuje formu G1 i G4, obě izoformy inhibuje přibližně stejně. BuChE neovlivňuje. Kromě inhibice AChE brání formování A β působením na α -sekretázy⁸¹. Účinnost donepezilu byla prokázána také u non-alzheimerovských demencí, indikován je i pro léčbu demencí s Lewyho tělísky. Klinické studie potvrdily zlepšení kognitivních funkcí u Parkinsonovy choroby, vaskulární demence a sclerosis multiplex^{83, 84}.

Rivastigmin (Exelon[®], Nimvastid[®])

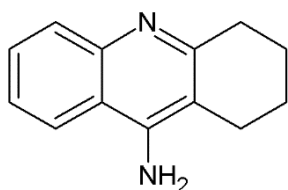
Rivastigmin je centrální pseudoireverzibilní inhibitor cholinesteráz, jehož struktura byla odvozena od kyseliny karbamové (**Obr. 8**). Vyznačuje se duální inhibicí AChE i BuChE. Inhibuje G1 i G4 formu AChE, přičemž je preferenční k formě G1. Stejně jako donepezil zasahuje do

metabolismu α -sekretáz, usnadňuje štěpení APP, a tím snižuje tvorbu $A\beta^{80,81}$. V současnosti je rivastigmin indikován k léčbě AD a demence s Lewyho tělísky. Je zkoušen i u dalších forem demence například u vaskulární demence a u mírné poruchy kognitivních funkcí⁸⁵. Klinické studie potvrdily zlepšení kognitivních funkcí u Parkinsonovy choroby. Míra efektu léčby Parkinsonovy nemoci byla srovnatelná s efektem rivastigminu v léčbě AD⁸⁶.

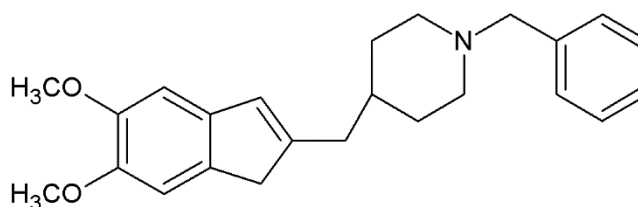
Galanthamin (Galantamin Mylan®)

Galanthamin je terciální alkaloid odvozený od fenanthrenu, svou strukturou se podobá kodeinu (**Obr. 8**). Původně byl izolován z rostlin, dnes je možná i jeho chemická syntéza. V největším množství se nachází v čeledi *Amaryllidaceae*, což jej řadí mezi amarylkovité alkaloidy. Galanthamin byl izolován z mnoha rostlin rodů čeledi *Amaryllidaceae*: *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Ungernia*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Zephyranthes*, *Hymenocallis*, a *Haemanthus*^{87, 88}.

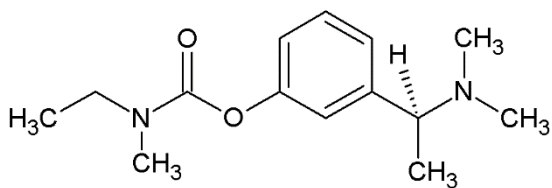
Galanthamin působí duálním mechanismem účinku – inhibuje enzymy AChE a BuChE a alostericky moduluje nikotinové receptory. Galanthamin je kompetitivním a reverzibilním inhibitorem cholinesteráz, AChE inhibuje selektivněji než BuChE (13–50krát). Korelace mezi inhibicí AChE a zlepšením kognitivních funkcí u pacientů s AD byla prokázána u donepezilu i rivastigminu. Účinnost galanthaminu jakožto inhibitory AChE nebyla dostatečně ověřena, neboť se většina studií zaměřuje na jeho alosterickou modulaci nikotinových receptorů. Tento mechanismus ovlivnění AD je zvláště slibný proto, že při AD dochází v mozku k redukci nikotinových receptorů, které jsou zvláště důležité pro paměť a učení. Mezi další popsání účinky patří antiapoptické působení chráníci buňky před $A\beta$, dále zvyšuje expresi antiapoptického proteinu Bcl-2⁸⁷.



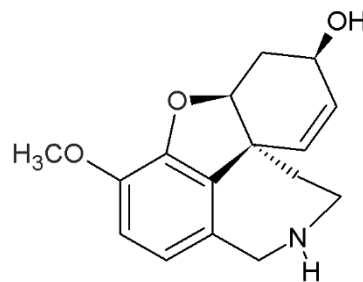
Takrin



Donepezil



Rivastigmin



Galanthamin

Obrázek 8: Inhibitory cholinesteráz

2. Inhibitory NMDA receptorů

Užívání inhibitorů vychází z glutamatergní hypotézy. Klinicky je zatím používán jediný antagonist NMDA receptorů memantin⁸⁹. Memantin je indikován k léčbě středně těžké až těžké formy AD buď samostatně nebo v kombinaci s inhibitory AChE⁶⁷.

Memantin (Ebixa[®], Mantomed[®], Marixino[®], Memantin Apotex[®], Memixa[®], Memolan[®])

Memantin jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů působí tím, že nahrazuje v iontovém kanálu magnesium a blokuje vstup vápenatých iontů do buněk. Memantin je jen nízce až středně afinitní a vysoce napěťově závislý, takže po příslušném impulzu z presynapse rychle opouští iontový kanál. Koncentrace memantinu potřebná pro zablokování excitotoxického působení glutamátu je 7-10x nižší, než koncentrace potřebná k zablokování všech impulzů. Proto blokuje memantin pouze patologickou, ale umožňuje fyziologickou aktivitu NMDA receptorů. Memantin dále blokuje serotoninové 5-HT₃ receptory, čímž usnadňuje proces učení (dlouhodobá potenciace) a paměti⁹⁰.

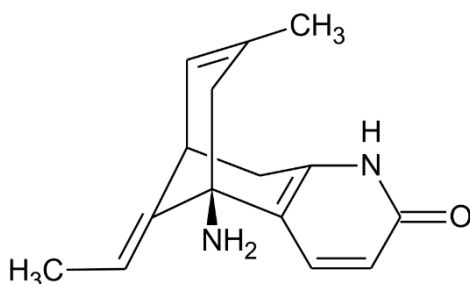
3.2.2.2 Perspektivní terapeutické možnosti AD

Nové inhibitory cholinesteráz

Huperzin A

Huperzin A byl poprvé izolován v roce 1986 z plavuně *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae)⁵⁵. Tento alkaloid se nachází v rostlinách čeledi Huperziaceae, Lycopodiaceae a rodu *Selaginella*. Největší zastoupení huperzinu A je ve vrancích *Huperzia serrata*, *H. herteriana* a *H. ovatifolia*^{55,91}. Huperzin A působí jako reverzibilní inhibitor AChE, na rozdíl od současných léčiv selektivně inhibuje G4 formu tohoto enzymu. Huperzin A zmírňuje apoptické procesy

vyvolané A β , má antioxidační vlastnosti, působí jako antagonist na NMDA receptorech. Podporuje regeneraci a růst mozkových buněk, které byly zasaženy hypoxií či ischemií^{59, 91}. Ve srovnání s klinicky používanými inhibitory AChE má lepší farmakokinetický profil a nižší periferní cholinergní účinky. Působí déle než donepezil a rivastigmin⁵⁵. V Číně je huperzin A ve 4. fázi klinického testování, jsou shromažďována data o nežádoucích účincích a účincích při dlouhodobém podávání v běžné klinické praxi⁵⁵ (**Obr. 9**).



Obrázek 9: Huperzin A

Amarylkovité alkaloidy jakožto inhibitory cholinesteráz

Nejvyšší inhibiční aktivitu na AChE vykazuje galanthaminový a lykorinový strukturní typ. Jednotliví strukturní zástupci jsou podrobněji rozebráni v předchozí kapitole.

Inhibitory enzymu prolyloligopeptidasy (POP)

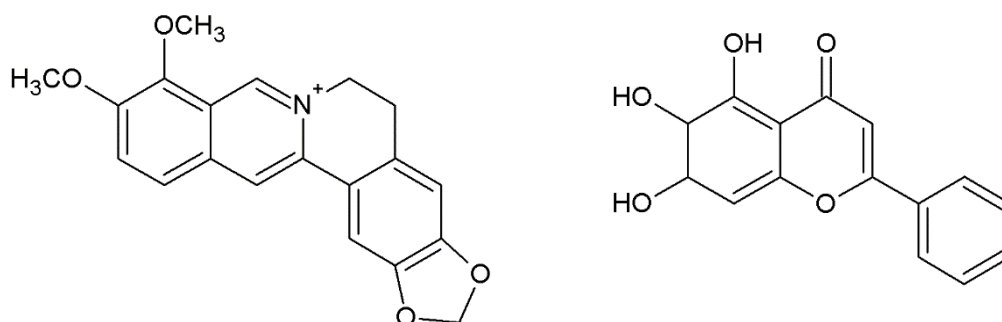
Prolyloligopeptidasa (POP) je cytozolová serinová proteáza, která štěpí malé peptidy obsahující prolin. Jejimi substráty jsou například substance P, thyreoliberin, β -endorfin nebo arginin-vazopresin. Některé z těchto působků jsou přímo spojeny s kognicí⁹². POP má význam ve fyziologických procesech jako je učení a paměť, buněčné dělení a diferenciace a signální transdukce. Předpokládá se, že hraje roli v patofyziologii některých psychiatrických onemocnění, a to v důsledku zapojení POP do metabolismu inositoltrifosfátu (IP3), klíčové molekuly buněčné signalizace. Neuropeptidy zvyšují hladinu IP3 vazbou na jeho receptory, které se nacházejí v membráně endoplazmatického retikula, a tím zvyšují hladinu vápenatých iontů. Předpokládá se, že kalcium má zcela zásadní význam pro paměť a učení. V současnosti se hledají inhibitory POP jakožto potenciální léčiva schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a některých kognitivních poruch jako je AD^{92, 93}.

Jedním z inhibitorů POP je berberin (**Obr. 10**). Jedná se o isochinolinový alkaloid izolovaný z oddenku koptisu čínského (*Coptis chinensis*, Ranunculaceae), dále se vyskytuje v rodu *Berberis* (dřišťál, Berberidaceae). Kromě inhibice POP vykazuje berberin ještě několik dalších

biologických aktivit, které jsou relevantní pro léčbu AD. Inhibuje AChE a BuChE, snižuje hladinu A β , inhibuje monoaminoxidasu a vykazuje antioxidační účinky^{94, 95}.

Jako standard inhibiční aktivity se v současnosti používá fenolický flavonoid bajkalin. Sloučenina byla izolována z šiřáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*, Lamiaceae). Bajkalin představuje přirozené proléčivo, které ve své glykované formě není schopné překonat hematoencefalickou bariéru. Při farmakokinetické studii na krysách se zjistilo, že se bajkalin před absorpcí štěpí střevní β -glukuronidasou na aglykon bajkalein. Bajkalein je lipofilnější, přes GIT (gastrointestinální trakt) vstupuje do krevního řečiště a přechází HEB (hematoencefalická bariéra). Bajkalein v závislosti na dávce inhibuje POP⁹².

Na našem pracovišti se hledaly potenciální inhibitory POP mezi isochinolinovými alkaloidy. Jako nejúčinnější látky byly vyhodnoceny kalifornidin, dihydrosanquinarin, corylpalmin a methyllaurotetanin. Zdá se, že kvartérní atom dusíku je podstatný při inhibici POP. Také je známo, že sloučeniny obsahující kvartérní dusík jsou aktivními inhibitory AChE⁹³.



Obrázek 10: Vzorce alkaloidu berberinu a vzorec bajkaleinu

Látky cílí na A β

Vývoj těchto léčiv vychází z poznatků amyloidní hypotézy, podle níž jsou za vznik toxického A β zodpovědné 2 enzymy: γ -sekretáza a β -sekretáza. Podle místa, na které tato léčiva zasahují, je lze rozdělit do několika skupin.

Modulátory γ -sekretázy

γ -Sekretáza je enzymový komplex podílející se na mnoha signálních drahách prostřednictvím svých substrátů. Nejznámější je díky své roli v AD, kde štěpí APP, což vede ke vzniku A β . Vzhledem ke skutečnosti, že je tento enzym významný i pro mnoho dalších fyziologických funkcí, vede jeho zablokování nejen k potlačení tvorby A β , ale i k závažným nežádoucím účinkům (poruchy imunity, krvetvorby). Tyto nežádoucí účinky vycházejí především z ovlivnění

informačního buněčného systému Notch^{71, 96}. V současnosti se hledají látky, které by činnost tohoto enzymu pouze modulovaly, tyto látky ovlivňující pouze část γ -sekretázy odpovědnou za štěpení APP⁹⁷. Tyto sloučeniny by měly poskytovat kratší peptidy A β , o velikosti 37-38 aminokyselin, které mají nižší agregabilitu. Současně by neměly působit na Notch, anglická literatura je označuje jako Notch-sparing⁹⁸. Byl zkoušen především R-enantiomer antirevmatika flurbiprofenu (R-flurbiprofen, flurizan, tarenflurbil). Přes dobrou toleranci nebylo kontrolovanými studii zjištěno podstatné zlepšení projevů Alzheimerovy choroby⁹⁷.

Inhibitory β -sekretázy

β -Sekretáza je ve studiích také označována jako BACE nebo BACE1 (β -site APP cleaving enzyme), Asp2 či memapsin-2⁹⁹. BACE1 je široce exprimovaný enzym, v největším množství jej najdeme v pankreatu a mozku, zejména v neuronech. BACE1 nejlépe funguje při kyselém pH. Má charakter transmembránové aspartátové proteázy, ve struktuře se nachází dvě aktivní místa lokalizovaná na luminální straně membrány. Takové umístění umožňuje enzymu přistupovat k substrátům v rámci uvedených organel, kde současně kompetuje s α -sekretázou o APP. BACE1 vykazuje vysokou substrátovou specifitu. Způsob štěpení APP je popsán výše¹⁰⁰. Vzhledem k jeho vlastnostem a roli v AD se jedná o jeden z molekulárních cílů v léčbě tohoto onemocnění. První generace těchto látek měla povahu peptidických inhibitorů. Tyto látky sice mají vysokou inhibiční aktivitu a jsou vysoce selektivní, ale nepřekonají HEB. Toto zjištění vedlo k hledání nepeptidových inhibitorů 2. generace, které by HEB přestoupily¹⁰⁰.

Sloučeniny nové generace mají lepší farmakologické vlastnosti, menší molekulovou hmotnost a lepší farmakokinetický profil. Většina z nich je ale substrátem effluxního transportéru P-glykoproteinu, což znamená, že se do mozku dostanou jen v nízké koncentraci. V reakci na to byla připravena ještě 3. generace těchto nízkomolekulárních látek. Tyto sloučeniny pronikají přes HEB v dostatečné koncentraci a významně redukuje množství A β . Ve třetí fázi klinického výzkumu se v současnosti nacházejí lanabecestat, elenbecestat a verubecestat^{101, 102}.

V rostlinách lze také najít přirozené fenolické inhibitory BACE1. Ve studii publikované roku 2004 se zjistilo, že extrakt zeleného čaje inhibuje aktivitu BACE1. Hlavním obsaženým polyfenolem byl epigalokatechin-gallát (EGCG), (**Obr. 11**). Studie došla k závěru, že EGCG inhibuje lipopolysacharidy indukované zvýšení hladin BACE1 a γ -sekretázy, čímž snižuje hladinu A β . Další flavonoidní inhibitory BACE1 shrnuje následující tabulka (**Tab. 10**). Předpokládá se, že hydroxylové skupiny v polohách C3' a C4' stabilizují vazbu flavonoidů

k aktivnímu centru BACE1 prostřednictvím vodíkových vazeb. Specifické nekompetitivní inhibitory byly izolovány také z lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra*, Fabaceae). Jedná se o deriváty 2,2',4'-trihydroxychalkonu. Některé alkaloidy vykazují aktivitu také vůči BACE1. Jako příklad lze uvést alkaloidy izolované z koptisu čínského (*Coptis chinensis*, Ranunculaceae) epiberberin a groenlandicin (hodnoty IC₅₀ 8.55 a 19.68 μM)¹⁰³.

Tabulka 10: Flavonoidní inhibitory BACE1¹⁰³

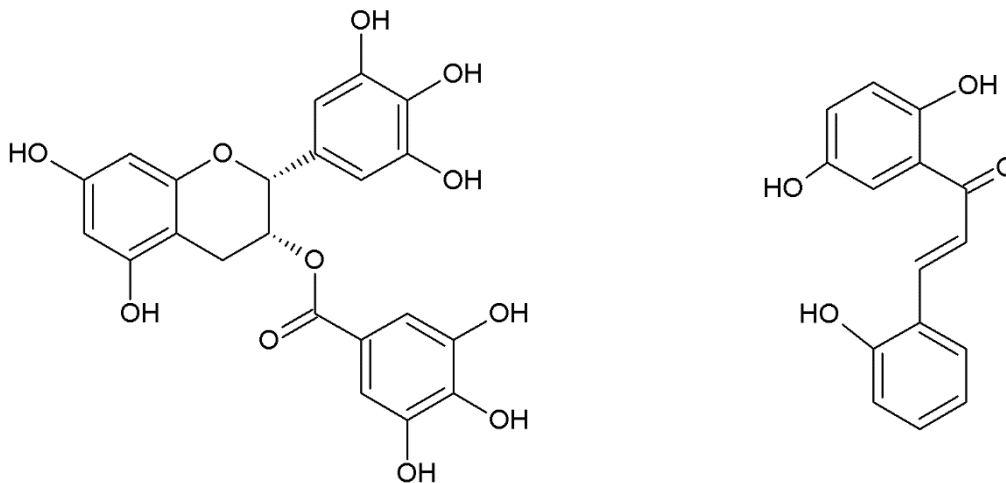
Látka	IC ₅₀ (μM)
Myricetin	2,8 ± 0,3
Morin	21,7 ± 1,1
Quercetin	5,4 ± 0,5
Bajkalein	cca 10
2,3-Dihydroamentoflavon	0,75
2,3-Dihydro-6-methylginkgetin	0,35

Aktivátory α-sekretázy

APP může být v prvním kroku štěpen α-sekretázou nikoli BACE1, čímž lze obejít tvorbu patologického Aβ. Stimulací tohoto enzymu snížíme tvorbu Aβ ve prospěch rozpustných produktů¹⁰⁴.

Zástupcem této skupiny je etazolát, u něhož byla dokončena II. fáze klinického testování. Sloučenina má kombinovaný mechanismus účinku, selektivně moduluje GABA_A receptor, je aktivátorem α-sekretázy a inhibítorem PDE4. Byla prokázána dobrá biologická dostupnost a zvýšení hladiny sAPPα.

Polyfenolová složka zeleného čaje EGCG také stimuluje α-sekretázu. Klinický přínos EGCG je studován (II/III fáze klinických testů). Studován je i cyklický lakton bryostatin, který snižuje hladinu Aβ_{40/42}, nyní se nachází v II. fázi klinických testů¹⁰⁰.



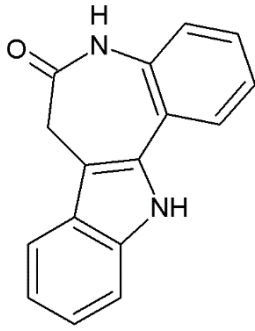
Obrázek 11: Epigalokatechin-gallát a 2,2',4'-trihydroxychalkon

Inhibitory enzymu GSK3 β

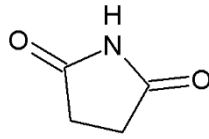
Tento enzym je klíčovým regulátorem metabolismu glukózy a syntézy glykogenu. GSK3 β má afinitu k mnoha substrátům, pro ilustraci lze zmínit APP, tau, transkripční faktory NF- κ B, Notch a p53. S ohledem na afinitu k těmto substrátům není překvapením, že je tento enzym potenciálním terapeutickým cílem nejen pro léčbu AD, ale i pro léčbu rakoviny, diabetu či zánětu^{105, 106}.

Mezi inhibitory GSK3 β se řadí strukturně různorodé látky jako deriváty thiazolidindionu, paullony, maleimidy, indirubiny a alkaloidy izolované z mořských hub (*Porifera sp*). Tuto aktivitu vykazuje i monovalentní kation lithia¹⁰⁶. Lithium (Li⁺) a tideglusib působí jako inhibitory GSK3 β . Byly provedeny i klinické studie, ve kterých ani jedna z látek nepotvrdila svoji účinnost¹⁰⁶.

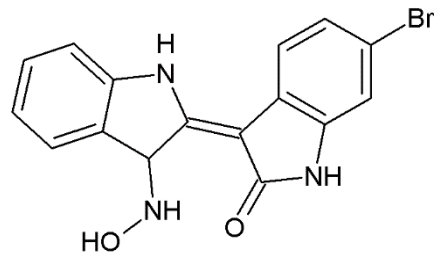
Paullony, maleimidy a indirubiny byly objeveny ve screeningovém programu, který byl zaměřen na hledání inhibitorů GSK3 β ¹⁰⁸ **obr. 12**. Deriváty benzazepinu, paullony, jsou ATP-kompetitivními inhibitory GSK3 β , které jsou účinné při nanomolárních hodnotách IC₅₀. Stejným způsobem inhibice enzymu se vyznačují i maleimidy. Indirubin lze izolovat z rostlin rodu indigovník (*Indigofera*)¹⁰⁹. Strukturně se jedná o bisindolový derivát, který je ATP-kompetitivním inhibitorem GSK3 β . Některé jeho deriváty vykazují vyšší inhibiční aktivitu než indirubin sám, příkladem je 6-bromoindirubin-3-oxim. Dalšími v přírodě se vyskytujícími inhibitory GSK3 β jsou alkaloidy izolované z mořských hub. Jako příklad lze uvést bromopyrrolový alkaloid hymenialdisin a β -karbolinový polycyklický alkaloid manzamin A¹⁰⁶.



Paullon



Maleimid



6-Bromoindirubin-3-oxim

Obrázek 12: Příklady inhibitorů GSK3 β

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Veškerá použitá rozpouštědla byla předem predestilována. Destilační předek činící cca 5 % byl zachycen většinou s vodným azeotropem, následně bylo destilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Všechna rozpouštědla byla uchovávána v hnědých lahvích.

Odpařování rozpouštědel z extraktů bylo prováděno pomocí vakuové odparky LABOROTA 4001- efficient, Heidolph, Germany vybavené vodní lázní při 40 °C za sníženého tlaku.

Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena způsobem gradientové eluce na neutrálním Al_2O_3 . Suspenze adsorbentu v rozpouštědle byla nalita do chromatografické kolony obvyklým způsobem. Na povrch sloupce byl nanesen vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla.

Tenkvrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna vzestupně. Použity byly klasické komory nasycené příslušnou mobilní fází. Doba sycení komor byla 25 minut.

4.1.2 Materiál a vybavení

4.1.2.1 Rozpouštědla

Chloroform, p. a. (Penta)

Cyklohexan, p. a. (Penta)

Dichlormethan, p. a. (Penta)

Diethylamin, p. a. (Penta)

Diethylether, p. a. (Penta)

Ethanol, p. a. (Penta)

Ethylacetát, p. a. (Penta)

Methanol, p. a. (Penta)

Toulen, p. a. (Penta)

4.1.2.2 Chemikálie

Kyselina chlorovodíková (Lachema)

Uhličitan sodný (Lachema)

Síran sodný (Lachema)

4.1.2.3 Detekční činidla

Mayerovo činidlo

Dragendorfovo činidlo

4.1.2.4 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1: To-DEA 95:5 (toulen, diethylamin)

S2: To-cHx-DEA 50: 50: 5 (toulen, cyklohexan, diethylamin)

S3: EtOH-CHCl₃ 1:9 (ethanol, chloroform)

S4: EtOAc-MeOH-H₂O 100: 13: 10 (ethylacetát, methanol, voda)

S5: To-EtOAc-DEA 70: 20: 10 (toulen, ethylacetát, diethylamin)

4.1.2.5 Chromatografické adsorbenty

A1: Oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii neutrální, Acros Organics, Brockmann I 50-200 µm, desaktivovaný 6 % vody.

A2: Kieselgel 60 F254, Merck; 20 x 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii; tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A3: Silikagel LS 5/40 UV₂₅₄; pro preparativní TLC

4.2 Příprava sumárního extraktu

4.2.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostlin *Narcissus cv. PROFESSOR EINSTEIN* byly získány od komerčního prodejce Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace rostlinného materiálu byla provedena Prof. L. Opletalem a dokladové vzorky jsou uloženy v herbáři na Katedře

farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod následujícím označením: CUFPH-16130/AL-447.

4.2.2 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu

Sumární ethanolický extrakt byl připraven z 34 kg čerstvých cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN.

Cibule byly nakrájeny a rozemlety. Pak byla provedena extrakce ethanolem (EtOH 96% v/v). Jednotlivá množství takto připravených cibulí (1,2 kg) se vařila dvakrát po třiceti minutách v destilační baňce pod zpětným chladičem. Vrstva cibulí byla převrstvena odpovídajícím množstvím EtOH tak, aby hladina byla přibližně 1–2 cm nad hmotu rostlinného materiálu. Extrakt byl zfiltrován a odpařen za sníženého tlaku.

Odparek byl rozpuštěn v 1,5 l 5% HCl, dvakrát zfiltrován přes vliselín a následně zředěn destilovanou vodou na 4,5 l o pH 1.

Vodný roztok byl odtučněn EtOAc, vytřepán 2x etherem a vodná fáze byla alkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 10. Následně byla provedena extrakce CHCl₃ (použity 4x 4l CHCl₃), při které alkaloidy přešly do vrstvy chloroformu (horní vrstva). Po čtyřech vytřepáních již extrakt nereagoval s Mayerovým činidlem.

Bylo připraveno 51,5 g alkaloidního extraktu ve formě tmavě hnědého sirupu. Extrakt byl opětovně rozpuštěn v 1 l 2% HCl. Tento primární alkaloidní extrakt byl podroben opakovanému čistícímu procesu za podobných podmínek.

Vodná fáze byla 2x odtučněna EtOAc (použito 2x 0,5l), alkalizována 10% Na₂CO₃ (použito 460ml) na pH 10. Dále byla vodná fáze 5x extrahována EtOAc (užito 5x 0,5l) a 8x CHCl₃ (užito 8x 0,5l). Takto získané organické extrakty byly spojeny a vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Celkem bylo získáno 31,73 g koncentrovaného alkaloidního extraktu ve formě tmavě hnědého sirupu. Vzhledem k náročnosti této části práce se na přípravě alkaloidního extraktu a jeho dalším zpracování podíleli další diplomanti a doktorandi katedry.

4.2.3 Sloupcová chromatografie a izolace jednotlivých alkaloidů

Adsorbent: 2000 g Al₂O₃ sušený 12 hodin při 200 °C a posléze deaktivovaný 6 % vody (2000 g Al₂O₃+ 120ml H₂O, voda byla přidána po třech částech během patnácti minut z celkových 60 minut mísení).

Frakce: 250ml

Mrtvý objem: 1570ml

Z koncentrovaného alkaloidního extraktu byl připraven roztěr v poměru 1:4 (124 g Al₂O₃). Extrakt byl rozpuštěn v potřebné množství CH₂Cl₂ a CHCl₃ a postupně nanesen na kolonu a rozdělen sloupcovou chromatografií za využití mobilní fáze se směsí benzínu a CHCl₃ (od poměru 30:70 do poměru 80:20), potom čistým CHCl₃, následně byl eluován CHCl₃ postupně obohacným o EtOH (od poměru 1:99 do poměru 50:50) a nakonec byla provedena eluce čistým EtOH. Při sloupcové chromatografii bylo získáno 494 frakcí (250 ml každé jednotlivé frakce). Tyto frakce byly kontrolovány pomocí TLC. Na základě této analýzy byly spojeny do 27 frakcí, které byly analyzovány pomocí GC-MS (**Tab. 11**).

Tabulka 11: Mobilní fáze použité při vyvíjení souhrnné TLC

Frakce	Spojené frakce	Mobilní fáze	Množství
	1–110	Benzín: CHCl ₃ (70:30) Benzín: CHCl ₃ (65:35) Benzín: CHCl ₃ (60:40) Benzín: CHCl ₃ (55:45) Benzín: CHCl ₃ (50:50)	Neobsahuje alkaloidy
1	111–145	Benzín: CHCl ₃ (45:55) Benzín: CHCl ₃ (40:60)	10 mg
2	146–150	Benzín: CHCl ₃ (40:60)	20 mg
3	151–158	Benzín: CHCl ₃ (40:60)	30 mg
4	159–173	Benzín: CHCl ₃ (40:60)	70 mg
5	174–177	Benzín: CHCl ₃ (40:60)	50 mg
6	178–187	Benzín: CHCl ₃ (35:65)	1,59g
7	188–191	Benzín: CHCl ₃ (35:65)	1,69g
8	192–195	Benzín: CHCl ₃ (35:65)	300 mg
9	196–199	Benzín: CHCl ₃ (35:65)	80 mg
10	200–215	Benzín: CHCl ₃ (35:65) Benzín: CHCl ₃ (30:70)	370 mg
11	216–221	Benzín: CHCl ₃ (30:70)	170 mg
12	222–297	Benzín: CHCl ₃ (30:70) Benzín: CHCl ₃ (25:75) Benzín: CHCl ₃ (20:80)	3,16 g
13	298–324	Benzín: CHCl ₃ (20:80) CHCl ₃ (100) CHCl ₃ : EtOH (99:1)	310 mg

Tabulka 11: Mobilní fáze použité při vyvíjení souhrnné TLC (pokračování)

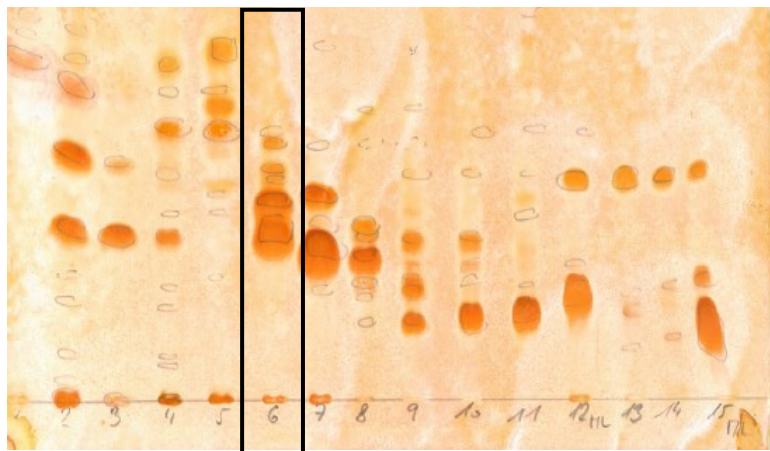
Frakce	Spojené frakce	Mobilní fáze	Množství
14	325–329	CHCl ₃ : EtOH (99:1)	183 mg
15	330–332	CHCl ₃ : EtOH (99:1)	828 mg
16	333–336	CHCl ₃ : EtOH (99:1)	616 mg
17	337–357	CHCl ₃ : EtOH (99:1)	1,2006 g
18	358–373	CHCl ₃ : EtOH (98:2)	1,426 g
19	374–381	CHCl ₃ : EtOH (98:2)	1,388 g
20	382–386	CHCl ₃ : EtOH (98:2)	1,134g
21	387–397	CHCl ₃ : EtOH (98:2)	585 mg
22	398–402	CHCl ₃ : EtOH (98:2) CHCl ₃ : EtOH (95:5)	127 mg
23	403–408	CHCl ₃ : EtOH (95:5)	182 mg
24	409–429	CHCl ₃ : EtOH (95:5) CHCl ₃ : EtOH (90:10)	936 mg
25	430–466	CHCl ₃ : EtOH (90:10) CHCl ₃ : EtOH (80:20)	6,543 g
26	467–478	CHCl ₃ : EtOH (80:20) CHCl ₃ : EtOH (50:50)	672 mg
27	479–493	CHCl ₃ : EtOH (50:50) EtOH (100)	941 mg
Celkem			24, 517 g

Po odpaření rozpouštědel byla provedena souhrnná TLC (**Tab. 12**).

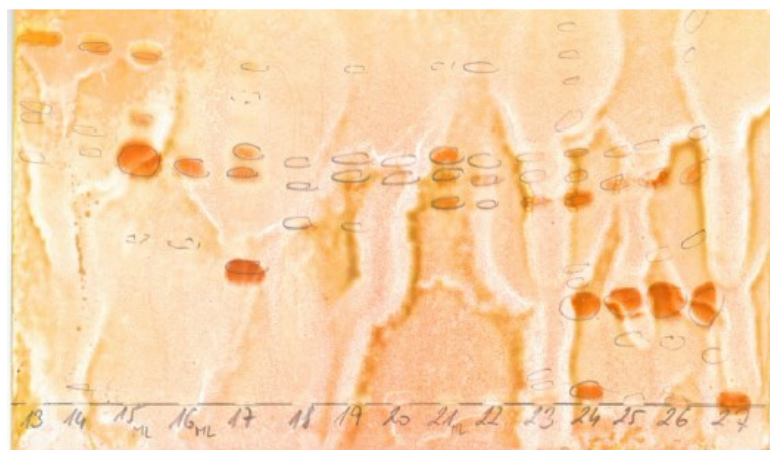
Tabulka 12: TLC jednotlivých frakcí a vyvíjecí soustavy

Frakce	Vyvíjecí soustava
137–204	To: EtOAc: DEA 7:2:1
205–272	To: EtOAc: DEA 45:45:10
273–372	To: EtOAc: DEA 15:75:10
373–376	EtOAc: DEA 9:1
377–416	EtOAc: MeOH: DEA 8:1:1
417–konec	EtOAc: MeOH: DEA 5:4:1

Během vyvíjení jednotlivých frakcí bylo použito 6 různých mobilních fází se zvyšující se polaritou (**Obr. 13, Obr. 14**).



Obrázek 13: Souhrnná TLC (frakce 1–15), mobilní fáze To: EtOAc: DEA, nosič A2

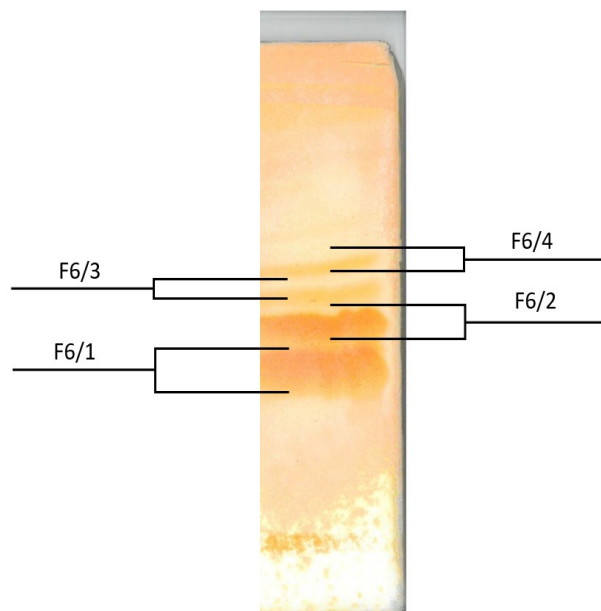


Obrázek 14: Souhrnná TLC (13–27 frakce), mobilní fáze EtOAc: MeOH: DEA 5:4:1, nosič A2

4.2.4 Zpracování frakce F6

Pro účely izolace alkaloidů v čistém stavu byla použita frakce 6. Frakce (1,59 g) byla rozpuštěna v CHCl_3 a následně nanese na 31 skleněných a podrobena preparativní TLC na vrstvě SiO_2 (adsorbent A3). Vyvíjení jednotlivých desek probíhalo v soustavě S1, která byla vybrána na základě analytické TLC. V této soustavě byly jednotlivé desky vyvíjeny vždy 3x. Na základě detekce pod UV-lampou byly z desek vypreparovány 4 zóny (**Obr. 15, Tab. 13**).

Všechny 4 zóny byly jednotlivě přečištěny následujícím způsobem. Výškrab byl smísen s SiO_2 (z desky), tato směs byla nanese na kolonu a promyta směsí EtOH: CHCl_3 (1:1). Po odpaření rozpouštědla a krystalizaci byly vzorky jednotlivých zón frakce 6 podrobeny GC-MS analýze.



Obrázek 15: Chromatogram frakce. Mobilní fáze S1, nosič A3, vyvíjeno 3x. Vizualizováno Dragendorfovým činidlem.

Tabulka 13: Obsahové látky jednotlivých podfrakcí frakce 6

Frakce	Hmotnost (g)	Obsahové látky
6/1	0, 5086	galanthamin, lykoraminon, narwedín
6/2	0, 3683	Galanthamin
6/3	0, 0465	karanin, galanthamin, pluviin
6/4	0, 0713	dle výsledků GC/MS nealkaloidní

Po odpaření rozpouštědla a krystalizaci byly vzorky F6/1, F6/2, F6/3 a F6/4 podrobeny analytické TLC (**Obr. 16, Obr. 17 a Tab. 14**). Jednotlivé podfrakce byly také analyzovány za využití GC/MS analýzy.



Obrázek 16: Chromatogram F6/1, F6/2, F6/3, F6/4 a F6. Mobilní fáze S1, nosič A2. Vizualizováno Dragendorfovým



Obrázek 17: Chromatogram F6/1, F6/2, F6/3. Mobilní fáze S2, nosič A2. Vizualizováno Dragendorfovým činidlem.

4.2.4.1 Zpracování podfrakce 1 (F6/1)

Tuto podfrakci v rámci své diplomové práce samostatně zpracovávala kolegyně Petra Hanusová.

4.2.4.2 Zpracování podfrakce (F6/2)

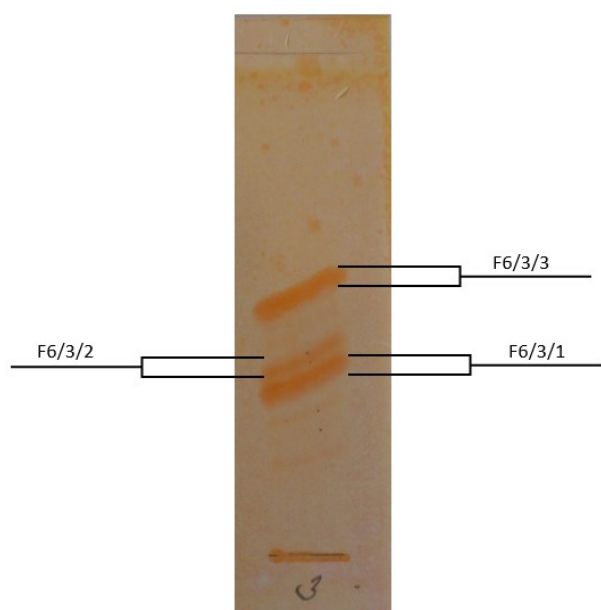
Z důvodu vysokého množství galanthaminu byla tato podfrakce podrobena krystalizaci ze soustavy EtOH:CHCl₃ (3:1), byly získány bílé krystaly (220 mg). Látka byla podrobena GC/MS analýze a identifikována jako galanthamin. Vzhledem k tomu, že tento alkaloid již byl na katedře izolován dříve byla pozornost zaměřena na další frakci, ve které se nacházely látky, které doposud nebyly na pracovišti izolovány.

4.2.4.3 Zpracování podfrakce 3 (F6/3)

Vzorek o hmotnosti 247 mg byl rozpuštěn v CHCl_3 , po rozpuštění byla získána žlutooranžová kapalina. Vzorek byl nanesen na 10 analytických desek a následně podroben preparativní TLC na vrstvě SiO_2 (adsorbent A2).

Vyvíjení jednotlivých desek probíhalo v soustavě S2, která byla stanovena na základě analytické TLC. V této soustavě byly jednotlivé desky vyvinuty vždy 3x. Na základě detekce pod UV-lampou byly z desek vypreparovány 3 zóny (**Obr. 18, Tab. 14**).

Všechny 3 zóny byly jednotlivě přečištěny následujícím způsobem. Výškrab byl smísen s SiO_2 (z desky), tato směs byla nanesena na kolonu a promyta směsí EtOH: CHCl_3 (1:1). Po odpaření rozpouštědla a krystalizaci byly vzorky jednotlivých zón podrobeny GC/MS analýze.



Obrázek 18: Chromatogram podfrakce 3. Mobilní fáze S2, nosič A2. Vizualizováno Dragendorffovým činidlem.

Tabulka 14: Obsahové látky podfrakce 3

Frakce	Hmotnost (mg)	Obsahové látky
6/3/1	17,2	Galanthamin
6/3/2	7,2	Karanin
6/3/3	3,2	Pluviin

4.2.5 Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů

GC/MS analýza

Analýza izolovaných alkaloidů byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 pracující s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV.

Separace byla prováděna na koloně HP-5. Byl použit následující teplotní program: 100 °C–180 °C (15 °C·min⁻¹), 180 °C (1 min), 180–300 °C (5 °C·min⁻¹), 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1 µl methanolického roztoku sumárního extraktu (koncentrace 1 mg·µl⁻¹) při splitu 1:10. Alkaloidy byly identifikovány porovnáváním jejich 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, které byly v naší laboratoři již izolovány.

Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl₃ při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S500 pracujícím při 499,87 MHz pro jádra ¹H a 125,70 pro jádra ¹³C. K ozařování a detekci signálu byla použita sonda OneNMR, širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaheny k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl₃ jsou u atomů ¹H δ = 7,26 ppm a u atomů ¹³C δ = 77,0 ppm. Měřením získaná data jsou uváděna v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita spekter ¹H NMR, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost alkaloidů byla měřena v jejich chloroformových roztocích na polarimetru P3000 a specifická otáčivost byla dopočítána podle vzorce:

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

t – teplota měření; D – sodíková čára D čára = 589,3 nm; α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace měřeného alkaloidu [g·100 ml⁻¹]; délka kyvety [dm].

4.2.6 Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů

4.2.6.1 Chemikálie

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (10mM roztok)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (10mM roztok)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich) (5mM roztok)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.2.6.2 Pufry

5mM Fosfátový pufr pH 7,4

5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

4.2.6.3 Materiál

Zdrojem acetylcholinesterasy byl hemolyzát lidských erytrocytů, zdrojem butyrylcholinesterasy lidská plazma. Měření bylo provedeno na mikrotitračních destičkách.

Přístroj použitý ke stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA).

4.2.6.4 Podmínky měření

Teplota 37 °C a prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)

Vlnová délka spektrofotometru 436 nm (HuAChE) a 412 nm (HuBuChE)

Mikrotitrační destičky

4.2.6.5 Příprava hemolyzátu a plazmy

Jako zdroj acetylcholinesterázy (AChE) byl použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy (BuChE) byla lidská plazma.

Erytrocyty byly získány z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru byla krev rozdělena stejnoměrně po

5 ml do šroubovacích zkumavek a provedena centrifugace při rychlosti 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Po první centrifugaci byla plazma odsáta tak, aby v ní nebyly erythrocyty, a byla uchována do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin). Zbytek plazmy z erythrocytárního sedimentu byl opatrně odsát bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička byla sestřížena, byl odečten objem erythrocytární masy a tento sediment byl zředěn takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby byl objem suspenze 13 ml. Obsah byl dobře promíchán, byla provedena centrifugace stejným způsobem, jak je uvedeno výše při oddělování plazmy. Promytí tímto způsobem bylo provedeno celkem 3x a promývací kapalina byla dokonale odstraněna. Po tomto promytí bylo přidáno takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erythrocyty: pufr 1 + 8–9, směs byla opět homogenizována, přelita do Erlenmayerovy baňky a erythrocyty byly ponechány spontánní hemolýze za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy byla u suspenze stanovena acetylcholinesterázová aktivita, případně byla 5mM fosfátovým pufrem upravena absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08 – 0,15) a naředěný hemolyzát byl uchován do doby použití při -22 °C.

Butyrylcholinesterázová aktivita plazmy byla stanovena stejným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15 – 0,20), byla uchovávána stejným způsobem jako hemolyzát.

4.2.6.6 Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)¹ [$\lambda = 436$ nm (AChE), nebo $\lambda = 412$ nm (BuChE)]. Byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

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

% I – procento inhibice; ΔA_{BI} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min;

ΔA_S – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, bylo přidáno se 283 μ l 5 mM DTNB, 8,3 μ l DMSO, po 1minutovém promíchání na mikrotřepačce byla směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10 mM butyrylthiocholinjodidu) a byla zjištěna absorbance při příslušné vlnové délce (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm). Obvyklým způsobem byl vypočten rozdíl a stanoven průměr se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: byly použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), stejný postup měření, a byly použity koncentrace látky: 40 mM, 10, 4, 1, 0,4, případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady bylo napipetováno DMSO jako slepý vzorek. Získané inhibiční aktivity IC_{50} AChE a IC_{50} BuChE pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem ($IC_{50, AChE} = 1,710 \pm 0,065 \mu M$, $IC_{50, BuChE} = 42,301 \pm 0,065 \mu M$), huperzinem A ($IC_{50, BuChE} = 0,033 \pm 0,001 \mu M$, $IC_{50, BuChE} > 1000 \mu M$) a berberinem ($IC_{50, AChE} = 0,705 \pm 0,104 \mu M$, $IC_{50, BuChE} = 30,721 \pm 3,492 \mu M$).

4.2.6.7 Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyl oligopeptidase

POP byla rozpuštěna v pufovaném fyziologickém roztoku PBS, specifická aktivita enzymu byla 0,2 U·ml⁻¹. Testování aktivit bylo provedeno na polystyrenové mikrotitrační destičce s rovným a průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny jejich rozpuštěním v DMSO (10 mM). Roztoky pro testování (10^{-3} – 10^{-7} M) byly připraveny ředěním zásobních roztoků superčistou vodou, slepé vzorky byly použity o stejné koncentraci DMSO. Jako substrát pro testování inhibiční aktivity byl použit Z-Gly-Pro-p-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 170 μ l PBS, 5 μ l roztoku testované látky o určité koncentraci a 5 μ l roztoku POP, následně došlo k inkubaci po dobu 5 min při teplotě 37°C. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno do každé jamky 20 μ l substrátu a směs byla znovu inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37°C. Sleduje se vznik p-nitroanilinu, který je přímo úměrný aktivitě POP, a je měřen spektrofotometricky při $\lambda = 405$ nm na microplate ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC_{50} . Získané inhibiční aktivity testovaných látek byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek berberinu ($IC_{50} = 142,3 \pm 21,1$ mM) a Z-Pro-prolinalu ($IC_{50} = 3,269 \pm 0,021$ nM).

4.2.6.8 Stanovení cytotoxicity, antimikrobiální, antifungální a antimalarické aktivity

Všechny studie týkající se cytotoxicity izolovaných látek byly provedeny ve spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze, s katedrou biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice a ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě v Hradci Králové. Podrobný soupis použitých chemikálií a vysvětlení postupů je možné nalézt v následujících publikacích Doskočil et al. (2015)⁴⁴ Havelek et al. (2014)¹¹².

Antimikrobiální a antifungální aktivita vybraných alkaloidů byla testována ve spolupráci s katedrou kvality zemědělských produktů na České zemědělské univerzitě v Praze. Podrobný popis experimentů je možné nalézt v následující literatuře Opletal et al. (2014)¹¹⁰ a Ločárek et al. (2015)¹¹¹.

Antimalarická aktivita byla testována ve spolupráci s Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa Portugal. Podrobný popis experimentů lze nalézt v následující literatuře Šafratová et al.¹¹³.

5 VÝSLEDKY

5.1 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv.

PROFESSOR EINSTEIN

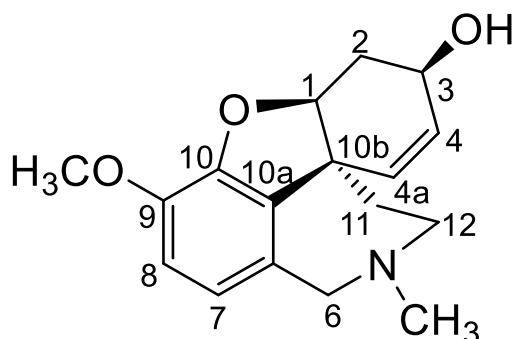
V rámci screeningové studie 80 pěstovaných odrůd rostlin rodu *Narcissus* L. byly provedeny GC/MS analýzy připravených alkaloidních extraktů. Tato rozsáhlá studie vedla k výběru rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN pro podrobnou fytochemickou práci za účelem izolace alkaloidů v čistém stavu pro další biologické studie.

5.2 Strukturní analýza izolovaných alkaloidů

5.2.1 Strukturní analýza galanthaminu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře¹¹⁴.

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$



Obázek. 19: Struktura galanthaminu

MS analýza

EIMS m/z (%): 287(83), 286(100), 270(15), 256(2), 244(30), 230(15), 216(39), 174(37), 128(9), 115(15)

NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C)

6,65 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-8), 6,60 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-7), 6,05 (1H, dd, $J = 10,4, 1,6$ Hz,

H-4a), 5,98 (1H, ddd, J = 10,4, 5,0, 1,3 Hz, H-4), 4,59 (1H, m, H-1), 4,12 (1H, m, H-3), 4,07 (1H, d, J = 15 Hz, H-6), 3,81 (3H, s, OMe), 3,66 (1H, dd, J = 15, 1,2 Hz, H-6), 3,25 (1H, ddd, J = 14,4, 12,8, 1,9 Hz, H-12), 3,03 (1H, ddd, J = 14,4, 4,0, 3,2 Hz, H-12), 2,6 – 2,8 (1H, m, H-2), 2,39 (3H, s, NMe), 2,07 (1H, ddd, J = 13,7, 12,8,0, 3,2 Hz, H-11), 1,99 (1H, ddd, J = 15,7, 5,0, 2,5 Hz, H-2), 1,56 (1H, ddd, J = 13,7, 4,0, 1,9 Hz, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C)

145,7 (C-10), 143,8 (C-9), 132,8 (C-10a), 129,2 (C-6a), 127,3 (C-4), 126,6 (C-4a), 121,7 (C-7), 111,1 (C-8), 88,4 (C-1), 61,7 (C-3), 60,3 (C-6), 55,7 (OMe), 53,6 (C-12), 47,9 (C-10b), 41,9 (NMe), 33,6 (C-11), 29,8 (C-2).

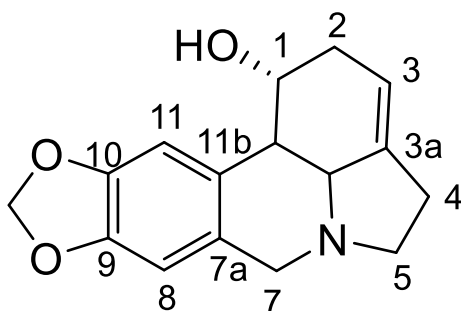
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -98^\circ$ (c = 0,15; CHCl₃)

5.2.2 Strukturní analýza karaninu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ¹H- a ¹³C-NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře^{115, 116}.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₃



Obrázek 20: Struktura karaninu

MS analýza karaninu

EIMS m/z (%): 271(86), 270(46), 252(52), 250(10), 240(12), 227(48), 226(100), 215(5)

NMR analýza karaninu

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C):

6,82 (s, H-12), 6,58 (s, H-8), 5,92 (d, $J=1.5$ Hz, H-11A), 5,90 (d, $J=1.5$ Hz, H-11B), 5,41 (m, H-3), 4,70 (m, H-1), 4,13 (d, $J=14.0$ Hz, H-7A), 3,52 (dd, $J=14,0$ a $2,2$ Hz, H-7B), 3,32 a 2,33 (m, H_2 -5), 2,59 (m, H-2), 2,78 (dd, $J=10,7$ and $2,6$ Hz, H-12c), 2,41 (ddd, $J=10,7$, $2,2$, a $2,0$ Hz, H-12b), 2,59 (m, H_2 -4).

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

44,9; 44,9; 48,8; 63,3; 65,8; 77,7; 81,6; 84,3; 111,6; 124,3; 131,8; 135,6; 136,2; 136,6; 136,8; 139,0; 151,2; 164,2.

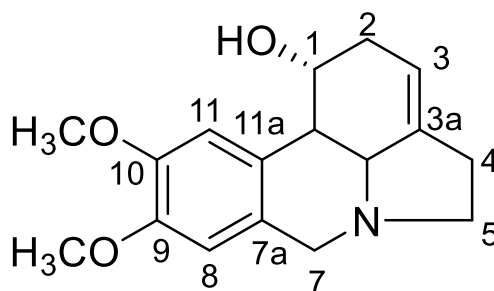
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -57,8^\circ$ ($c = 0,3$; EtOH)

5.2.3 Strukturní analýza pluviinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře^{115, 116}.

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$



Obrázek 21: Struktura pluviinu

MS analýza pluviinu

EIMS m/z (%): 287(81), 286(48), 268(52), 254(15), 243(66), 242(100), 228(23)

NMR analýza pluviinu

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25 °C)

6,74 (s, H-11), 6,64 (s H-8), 5,97 (dd, J=5,9, 1,0, Hz, H-1), 5,39 (d, J=2,2 Hz, H-3), 4,26 (dd, J=5,9, 1,0, Hz, H-1), 4,13 a 3,50 (1H each, d, J=14,5 Hz, H₂-7), 3,34 a 2,37 (1H, m, H₂-5), 2,76 (d, J=9,9 Hz, H-11c), 2,66 (d, J=9.9 Hz, H-11b), 2,62 a 2,33 (m, H₂-2), 2,59 (m, H₂-4), 114,5-2,0 (10H).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C)

46,6; 46,6; 63,3; 66,3; 79,1; 85,6; 87,7; 91,9; 122,0; 123,4; 131,9; 136,1; 139,4; 152,4; 164,2.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -160^\circ$ (c = 0,15; MeOH)

5.3 Výsledky provedených biologických testů ve vztahu k Alzheimerově chorobě

Alkaloidy byly testované na in inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám a POP, inhibiční aktivity jsou shrnuty v tabulce (**Tab. 15**).

Tabulka 15: Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP

Alkaloid	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)	IC ₅₀ POP (mM)
Karanin	320 ± 42	486 ± 56	> 1000
Pluviin	BT	BT	BT
Galanthamin	1,71 ± 0,07	42,3 ± 1,3	> 1000
Berberin	0,71 ± 0,01	30,7 ± 3,5	0,14 ± 0,02
Z-Pro-prolinal	NT	NT	3,27 * 10 ⁻⁶ ± 0,02 * 10 ⁻⁶

NT-netestováno, BT- bude testován

5.4 Cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů

Alkaloidy byly testovány na 2 liniích buněk kolorektálního adenokarcinomu s mutací p53 (Caco-2 a HT-29), tyto linie buněk jsou rezistentní k apoptóze (**Tab. 16**).

Tabulka 16: Cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů vůči buňkám kolorektálního adenokarcinomu

Sloučenina	Nádorové buňky		Normální buňky
	Caco-2 IC ₅₀ (μM)	HT-29 IC ₅₀ (μM)	FHs-74 Int IC ₅₀ (μM)
Galanthamin	61,43 ± 1,56	49,27 ± 2,38	67,63 ± 7,70
Karanin	64,43 ± 4,48	46,56 ± 1,81	> 100
Pluviin	BT	BT	BT
Vinorelbin	0,03 ± 0,00	NT	4,0 ± 0,3

NT-netestováno, BT- bude testován

5.5 Antimikrobiální a antifungální aktivita izolovaných alkaloidů

Antimikrobiální a antifungální aktivita izolovaných alkaloidů byla studována ve spolupráci s Katedrou kvality zemědělských produktů na České zemědělské univerzitě v Praze. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (**Tab. 17**).

Tabulka 17: Antibakteriální a antifungální aktivita izolovaných alkaloidů

Alkaloid	MIC ₈₀ /MFC (μg/mL)			MIC ₈₀ (μg/mL)	
	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Lodderomyces elengiosporus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Galanthamin	512	-	512	512	2048
Karanin	128	512	256	512	2048
Pluviin	BT	BT	BT	BT	BT

MIC- minimální inhibiční koncentrace, MFC- minimální fungicidní koncentrace, BT- bude testován

5.6 Antimalarická aktivita izolovaných alkaloidů

Ve spolupráci s Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa Portugal byla testována antimalarická aktivita karaninu na jaterních stadiích *Plasmodium falciparum*. Karanin ani galanthamin nevykazovali antimalarickou aktivitu (IC₅₀ > 100 μM). Alkaloid pluviin bude testován v dohledné době.

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce byl podíl na přípravě alkaloidního extraktu z rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN a kompletní zpracování zpracování jedné frakce za účelem izolace alespoň dvou alkaloidů v čistém stavu a příprava jejich vzorků na testy biologických aktivit. Metodou sloupcové chromatografie byl rozdělen připravený sumární alkaloidní extrakt. Přidělená frakce (frakce č. 6) byla zpracovávána za využití preparativní TLC, která byla použita opakovaně. Podařilo se izolovat tři alkaloidy v čisté formě. Prvním alkaloidem byl galanthamin (17,2 mg), alkaloid patřící do galanthaminového strukturního typu, zbývající dva alkaloidy byly lykorinového strukturního typu, karanin (7,2 mg) a pluviin (3,2 mg), které se od sebe liší pouze otevřením dioxanového kruhu u pluviinu. Všechny tři alkaloidy byly již z rostlin rodu *Narcissus* v minulosti izolovány a některé z nich byly studovány na různé biologické aktivity.

Pluviin byl v minulosti izolován vícekrát, ale o jeho biologických aktivitách je v literatuře uvedeno pouze málo informací. Alkaloid pluviin je součástí biosyntetické dráhy, která prostřednictvím intramolekulárního spojení *ortho-para'* vede ke vzniku homolykorinu nebo lykorinu¹². U většiny rostlin se biosyntéza zřejmě posune od pluviinu, meziprojektu této dráhy, směrem k homolykorinu. Příkladem je *Narcissus eugeniae*, u něhož byly studovány dvě populace tohoto druhu. Rostliny vykazovaly obdobné alkaloidní profily s určitou mezipopulační variabilitou. Zatímco u některých rostlin končí biosyntetická dráha syntézou pluviinu, tak u jiných se posunula právě směrem k homolykorinovému strukturnímu typu¹⁸. U většiny rostlin, ze kterých byl pluviin dodnes izolován, byl tento alkaloid nalezen v tak malých množstvích, že nebylo možné provést biologické testy.

Alkaloid karanin byl v minulosti izolován z celé řady rostlin rodu *Narcissus*, například lze uvést *Narcissus* cv. Ice Follies³, *Narcissus* cv. Livia³ a další. Karanin byl izolován i z dalších zástupců rostlin čeledi Amaryllidaceae, například z rostliny *Brunsvigia rosea*¹¹⁷, *Ammocharis coranica*¹¹⁷, *Nerine bowdenii*³⁹ nebo z *Galanthus transcaucasicus*¹¹⁸. V literatuře je popsána celá řada biologických aktivit karaninu. Nejzajímavější je asi působení karaninu na řadu linií nádorových buněk (A549-buněčná linie alveolárního adenokarcinomu, SK-MEL-buněčná linie melanomu), které jsou rezistentní k apoptóze¹¹⁹, dále vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE, slabý analgetický a hypotenzní účinek³.

Galanthamin byl poprvé identifikován a popsán roku 1955 v *Galanthus woronowii*. Tento alkaloid byl izolován z mnoha rostlin rodů čeledi Amaryllidaceae: *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Ungernia*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Zephyranthes*, *Hymenocallis*^{87, 88} a další. Vzorky izolovaných alkaloidů byly podrobeny testu inhibiční aktivity vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE Ellmanovou spektrofotometrickou metodou, dále pak testu na stanovení cytotoxické aktivity a ve spolupráci s dalšími pracovišti byla studována antifungální, antimikrobiální a antimalarická aktivita.

V testu na stanovení inhibiční aktivity vůči lidské erytrocytární AChE a sérové BuChE byl testován karanin. Galanthamin, v současnosti jediný klinicky užívaný alkaloid čeledi Amaryllidaceae, byl použit jako standard. Karanin vykazoval mírnou inhibiční aktivitu vůči oběma cholinesterázám ($IC_{50, HuAChE} = 320 \pm 42 \mu M$ a $IC_{50, HuBuChE} = 486 \pm 56 \mu M$). V souvislosti s AD byla dále zjišťována inhibiční aktivita vůči POP, jako referenční látky byly použity Z-Pro-prolinal a berberin. Karanin a galanthamin nevykázali zajímavou POP inhibiční aktivitu. Cytotoxicita izolovaných alkaloidů byla testována na 2 liniích buněk kolorektálního adenokarcinomu s mutací p53 (Caco-2 a HT-29), jako standard byl použit vinorelbin. Galanthamin vykazuje mírné cytotoxické působení na obě linie nádorových buněk ($IC_{50, Caco-2} = 61,43 \pm 1,56 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = 49,27 \pm 2,38$), rovněž působí na buňky zdravé. Karanin dosahuje obdobných hodnot jako galanthamin ($IC_{50, Caco-2} = 64,43 \pm 4,48 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = 46,56 \pm 1,81 \mu M$), ale na rozdíl od galanthaminu nezasahuje zdravé buňky.

V rámci antimikrobiální studie galanthamin a karanin vykazovaly mírnou antimikrobiální a antifungální aktivitu vůči *C. dubliniensis*, *L. elengiosporus* a *E. coli*. Oba alkaloidy byly otestovány ještě vůči *Candida albicans* a *Staphylococcus aureus*. Karanin disponoval slabou inhibiční aktivitou vůči *C. albicans* ($MIC_{80} = 512 \mu g/mL$), galanthamin mírně inhiboval růst *S. aureus* ($MIC_{80} = 2048 \mu g/mL$). Při hodnotách vyšších než 512 $\mu g/mL$ (pro kvasinky a houby) a při hodnotách vyšších než 2048 $\mu g/mL$ (pro bakterie) jsou alkaloidy považovány za neaktivní. Závěrem lze shrnout, že karanin je zajímavá struktura, i když látka nedisponuje významnou biologickou aktivitou ve srovnání s jinými alkaloidy lykorinového strukturního typu. Svoji strukturou ale přispívá do studií vztahu struktura vs. aktivita Amaryllidacea alkaloidů lykorinového strukturního typu. Jak již bylo zmíněno, alkaloid pluviin byl izolován pouze v množství, které umožnilo pouze strukturní identifikaci a pro screening biologických aktivit musí být izolován ve větším množství. Problémem obou alkaloidů je jejich nízká přítomnost v rostlinném materiálu, druhou možností by byla jejich semisyntetická příprava z alkaloidu

lykorinu. Poslední izolovaný alkaloid galanthamin je jediným představitelem Amaryllidaceae alkaloidů, který je používán v klinické praxi, v terapii Alzheimerovy choroby, do dnešní doby byl intenzivně studován ze širokého spektra pohledů a byl podrobněji přiblížen v teoretické části diplomové práce.

7 LITERATURA

1. Tomko, J., Kresánek, J., & Hubík, J. (1999). Farmakognózia. 2. vyd. *Martin: osveta*.
2. Spilková, J., Martin, J., Siatka, T., Tůmová, L., & Kašparová, M. (2016). *Farmakognozie*. Charles University in Prague, Karolinum Press.
3. Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J. (2013). Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Industrial Crops and Products*, *43*, 237-244.
4. Berkov, S., Codina, C., & Bastida, J. (2012). The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds. In *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech.
5. 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*(6), 11713-11741.
6. Opletal, L. Daidalea-Univerzita Karlova [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>
7. Herbář Wendys [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/287-galanthus-nivalis-snezenka-podsneznik>
8. Herbář Wendys [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/10-leucojum-vernum-bledule-jarni>
9. Herbář Wendys [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/308-narcissus-poeticus-narcis-bily>
10. Stevens, P. Angiosperm Phylogeny Website [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>
11. Shawky, E. (2016). Phytochemical and biological Investigation of *Clivia nobilis* flowers Cultivated in Egypt. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *15*(3), 531.
12. Bastida, J., Berkov, S., Torras Claveria, L., Pigni, N. B., Andradre, J. P. D., Martínez, V., Codina, C., Viladomat Meya, F. (2011). Chemical and biological aspects of

Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011, Chapter 3, p. 65-100. Editor: Diego Muñoz-Torrero.*

13. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X., & Hong, X. (2015). Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances, 5*(21), 16562-16574.
14. 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.
15. Hanks, G. R. (Ed.). (2003). *Narcissus and daffodil: the genus Narcissus*. CRC Press.
16. Singh, A., & Desgagné-Penix, I. (2014). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today, 1*(3), 114-120.
17. Cahlíková, L. (2014). *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva* (Habilitation práce). Praha, Karlova univerzita.
18. Berkov, S., Martínez-Francés, V., Bastida, J., Codina, C., & Ríos, S. (2014). Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry, 99*, 95-106.
19. Pigni, N. B., Ríos-Ruiz, S., Luque, F. J., Viladomat, F., Codina, C., & Bastida, J. (2013). Wild daffodils of the section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a source of mesembrane alkaloids. *Phytochemistry, 95*, 384-393.
20. The American Daffodil Society [online]. 2017 [cit. 2017-0223].
Dostupné z: <http://daffodilusa.org/daffodil-info/daffodil-divisions-cultivars/>
21. Jones M., Pulman J., Walker T. Chemistry and Industry [online]. 2017 [cit. 2017-0223].
Dostupné z: <http://www.soci.org/Chemistry-and-Industry/Cnl-Data/2011/4/Drugs-from-DAFFODILS>
22. Labraña, J., Machocho, A. K. O., Kricsfalusy, V., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J. (2002). Alkaloids from *Narcissus angustifolius subsp. transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry, 60*(8), 847-852.
23. Bastida, J., Llabrés, J.M., Viladomat, F., Codina, C., Rubiralta, M. and Feliz, M. (1987) Narcissus alkaloids, III. 9-O-demethylhomolycorine from *Narcissus confusus*. *Journal of Natural Products, 50*(2), 199–202.
24. Boit, H. G., Stender, W., & Beitner, A. (1957). XVII. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide. Die Alkaloide einiger Gartensorten von *Narcissus Jonquilla*, *N. Triandrus* und *N. Cyclamineus*. *Chemische Berichte, 90*(5), 725-728.

25. Kreh, M., & Matusch, R. (1995). *O*-Methyloduline and *N*-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry*, 38(6), 1533-1535.
26. Kreh, M., Matusch, R., & Witte, L. (1995). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, 38(3), 773-776.
27. Piozzi, F., Marino, M.L., Fuganti, C. & Di Martino, A. (1969) Occurrence of non-basic metabolites in Amaryllidaceae. *Phytochemistry*, 8(9), 1745–1748.
28. Ma, G.E., Li, H.Y., Lu, C.E., Yang, X.M. & Hong, S.H. (1986) 6 α /6 β -Hydroxy-3-*O*-methylepipimaritidine, two new alkaloids from *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem. *Heterocycles*, 24(8), 2089–2092.
29. Pigni, N. B., Ríos-Ruiz, S., Martínez-Frances, V., Nair, J. J., Viladomat, F., Codina, C., & Bastida, J. (2012). Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *Journal of Natural Products*, 75(9), 1643-1647.
30. Labraña, J., Choy, G., Solans, X., Font-Bardia, M., de la Fuente, G., Viladomat, F., Codina, C. & Bastida, J. (1999) Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*, 50(1), 183–188.
31. Bastida, J., Contreras, J.L., Codina, C., Wright, C.W. & Phillipson, J.D. (1995) Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochemistry*, 40(5), 1549–1551.
32. Cahlíková, L., Benešová, N., Macáková, K., Kučera, R., Hrstka, V., Klimeš, J., Jahodář, L. & Opletal, L. (2012). Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, 7(5), 571-574.
33. Abou-Donia, A.A., Darwish, F.A. & Ghazy, N.M. (1989) Alkaloids of *Narcissus tazetta* L. grown in Egypt. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 122–123.
34. Döpke, W., & Sewerin, E. (1981). Zur Struktur des Narcimarkins. *Zeitschrift für Chemie*, 21(2), 71-71.
35. Pettit, G. R., Tan, R., Bao, G. H., Melody, N., Doubek, D. L., Gao, S., Chapuis, J. & Williams, L. (2012). Antineoplastic agents. 587 Isolation and structure of 3-epipancreatistatin from *Narcissus* cv. Ice Follies (1). *Journal of Natural Products*, 75(4), 771-773.
36. Fu, K. L., Li, X., Ye, J., Lu, L., Xu, X. K., Li, H. L., Zhang, W.D., & Shen, Y. H. (2016). Chemical constituents of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and their antioxidant activities. *Fitoterapia*, 113, 110-116.
37. Patočka J. Toxicology [online]. 2008 [cit. 2017-0224].

Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=178>

38. Cao, Z., Yang, P., & Zhou, Q. (2013). Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, 56(10), 1382-1391.
39. Cahlíková, L., Zavadil, S., Macáková, K., Valterová, I., Kulhánková, A., Hošťálková, A., Kuneš, J. & Opletal, L. (2011). Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Communications*, 6(12), 1827-1830.
40. de Andrade, J. P., Pigni, N. B., Torras-Claveria, L., Guo, Y., Berkov, S., Reyes-Chilpa, R., el Amrani, A., Zuanazzi, J.A., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J. (2012). Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 83-98.
41. Pigni, N. B., Berkov, S., Elamrani, A., Benaissa, M., Viladomat, F., Codina, C., & Bastida, J. (2010). Two new alkaloids from *Narcissus serotinus* L. *Molecules*, 15(10), 7083-7089.
42. Henry, S., Kidner, R., Reisenauer, M. R., Magedov, I. V., Kiss, R., Mathieu, V., Lefranc, F., Dasari, R., Evidente, A., Yu, X., Ma, X., Pertsemliadis, A., Cencic, R., Pelletier, R., Cavazos, D.A., Brenner, A.J., Aksenov, A.V., Rogelj, S., Kornienko, A., & Frolova L.V. (2016). 5,10b-Ethanophenanthridine Amaryllidaceae alkaloids inspire the discovery of novel bicyclic ring systems with activity against drug resistant cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120, 313-328.
43. Luchetti, G., Johnston, R., Mathieu, V., Lefranc, F., Hayden, K., Andolfi, A., Lamoral-Theys, D., Reisenauer, M.R., Champion, C., Pelly, S.C., van Otterlo, W. A., Magedov, I. V., Kiss, R., Evidente, A., Rogelj, S., & Kornienko, A. (2012). Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells. *ChemMedChem*, 7(5), 815-822.
44. Doskočil, I., Hošťálková, A., Šafratová, M., Benešová, N., Havlík, J., Havelek, R., Kuneš, J., Královec, K., Chlebek, J., & Cahlíková, L. (2015). Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*, 13, 394-398.
45. Griffin, C., McNulty, J., & Pandey, S. (2011). Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 38(6), 1549.

46. Griffin, C., Karnik, A., McNulty, J., & Pandey, S. (2011). Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(1), 57-68.
47. Kornienko, A., & Evidente, A. (2008). Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews*, 108(6), 1982-2014.
48. Fürst, R. (2016). Narciclasine-an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. *Planta Medica*, 82(16), 1389-1394.
49. Wildman, W. C., & Bailey, D. T. (1967). Pretazettine. *Journal of the American Chemical Society*, 89(21), 5514-5515.
50. Cordell, G. A. (2008). *The Alkaloids: chemistry and biology* (Vol. 65). Academic Press.
51. da Silva, A. F. S., de Andrade, J. P., Bevilaqua, L. R., de Souza, M. M., Izquierdo, I., Henriques, A. T., & Zuanazzi, J. Â. S. (2006). Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(1), 148-154.
52. Stafford, G. I., Birer, C., Brodin, B., Christensen, S. B., Eriksson, A. H., Jäger, A. K., & Rønsted, N. (2013). Serotonin transporter protein (SERT) and P-glycoprotein (P-gp) binding activity of montanine and coccinine from three species of *Haemanthus* L. (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany*, 88, 101-106.
53. Silva, A. F. S., De Andrade, J. P., Machado, K. R. B., Rocha, A. B., Apel, M. A., Sobral, M. E. G., Henriques, A. T., & Zuanazzi, J. A. S. (2008). Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*, 15(10), 882-885.
54. Evidente, A., Andolfi, A., Abou-Donia, A. H., Touema, S. M., Hammada, H. M., Shawky, E., & Motta, A. (2004). (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry*, 65(14), 2113-2118.
55. Martin, J., Kršková, Z., Dušek J. (2011) Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, 7, 39-41.
56. Jiráček, R. (2003). Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká geriatrická revue*, 2003(2), 10-12.
57. Ressler, P. (2004). Alzheimerova choroba-diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, 4(1), 11-16.

58. Franková, M. V. (2016) Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Psychiatria pre prax*, 17(4), 140-142.
59. Bai, D. L., Tang, X. C., & He, X. C. (2000). Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 7(3), 355-374.
60. Pydychová, E. (2002). Alzheimerova nemoc. *Solutio*, 2003, 21-28.
61. Seven Stages of Alzheimer's. In: Alzheimer's association [online]. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp
62. Goetz, C. G. (Ed.). (2007). *Textbook of clinical neurology* (Vol. 355). Elsevier Health Sciences.
63. LANGE-ASSCHENFELDT, Christian. *Patophysiologie, Diagnostik und Therapie der Alzheimer Demenz* [online]. 2009 [cit. 2017-03-10].
Dostupné z: https://www2.hhu.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Alzheimer_fuer_FORTE_PHARM2009.pdf
64. Amiri, H., Saeidi, K., Borhani, P., Manafirad, A., Ghavami, M., & Zerbi, V. (2013). Alzheimer's disease: pathophysiology and applications of magnetic nanoparticles as MRI theranostic agents. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(11), 1417-1429.
65. Tam, J. H., & Pasternak, S. H. (2012). Amyloid and Alzheimer's disease: inside and out. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 39(03), 286-298.
66. Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Manchester, L. C., Fuentes-Broto, L., Korkmaz, A., Ma, S., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 167-202.
67. Sheardová, K., Hort, J., Rusina, R., Bartoš, A., Línek, V., Ressner, P., & Rektorová, I. (2007). Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*, 70/103(5), 589–594
68. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
69. Kornbuser, J., & Wiltfang, J. (1998). The role of glutamate in dementia. In *Ageing and Dementia* (pp. 277-287). Springer, Vienna.

70. Krystal, J. H., D'Souza, D. C., Petrakis, I. L., Belger, A., Berman, R. M., Charney, D. S., Abi-Saab, W., & Madonick, S. (1999). NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders. *Harvard Review of Psychiatry*, 7(3), 125-143.
71. Jiráček R. (2009). Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí. *Neurologie pro praxi*, 10(6), 384–389.
72. Brunovský, M. (2007). Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, 2, 112-117.
73. Chmátalová, Z., & Skoumalová, A. (2014). Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus*, 22(4).
74. Zeman M., Jiráček R., Raboch J., Vecka M., & Žák A. (2010). Inzulínová rezistence a neuropsychiatrická onemocnění. *Česká a slovenská psychiatrie*, 106(5), 300-306.
75. Zeman, M., Jiráček, R. (2012). Alzheimerova choroba a diabetes mellitus typu 2, *Neurologie pro praxi*, 13(2), 105-108.
76. Ott, A., Stolk, R. P., Van Harskamp, F., Pols, H. A. P., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia The Rotterdam Study. *Neurology*, 53(9), 1937-1937.
77. Jiráček R. (2008) Farmakoterapie demencí. *Praktické lékařství*, 4(6), 286-290
78. Pidrman, V., Horáček, J., & Látalová K. (2003). Interdisciplinární přístup v léčbě demence inhibitory cholinesteráz, *Psychiatrie pro praxi*, 2003 (3), 112-117.
79. Horak, M., Holubova, K., Nepovimova, E., Krusek, J., Kaniakova, M., Korabecny, J., Vyklicky, L., Kuca, K., Stuchlik, A., Ricny, J., Vales, K., & Soukup, O. (2017). The pharmacology of tacrine at N-methyl-d-aspartate receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*.
80. Pidrman, V. (2007). Demence. *Grada Publishing as*, 117-120.
81. Holden, M., & Kelly, C. (2002). Use of cholinesterase inhibitors in dementia. *Advances in Psychiatric Treatment*, 8(2), 89-96.
82. Wu, M. Y., Esteban, G., Brogi, S., Shionoya, M., Wang, L., Campiani, G., Unzeta, M., Inokuchi, T., Butini, S., Marco-Contelles, J. (2016). Donepezil-like multifunctional agents: design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, 864-879.
83. Slíva J., & Jiráček R. (2004) Donepezilum. *Remedia*, 14(6).

84. Cummings, J., Lai, T. J., Hemrungrojn, S., Mohandas, E., Yun Kim, S., Nair, G., & Dash, A. (2016). Role of donepezil in the management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 22(3), 159-166.
85. Vnoučková K., & Jiráček R. (2003) Rivastigminum. *Remedia*, 13(6), 372-378.
86. Rektorová, I. (2006). Rivastigmin v léčbě demence u Parkinsonovy nemoci. *Remedia*, 16(6), 609-613.
87. Cibičková, L., & Palička, V. (2005). Galanthamin v terapii Alzheimerovy demence. *České geriatrické revue*, 3(2), 29-34.
88. 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(2), 1170-1176.
89. Dušek K., Večeřová-Procházková A. (2015). *Diagnostika a terapie duševních poruch* (str. 478). Grada Publishing, druhé přepracované vydání, Praha.
90. Švestka, J. (2004). Memantin-necholinergní alternativa léčby alzheimerovy a vaskulární demence. *Psychiatrie pro praxi*, 3, 154-159.
91. Drtinová, L., & Pohanka, M. (2013). Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chem. Listy*, 107, 12-15.
92. Tarragó, T., Kichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixidó, M., & Giralt, E. (2008). Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), 7516-7524.
93. Cahlíková, L., Hulová, L., Hrabínová, M., Chlebek, J., Hošťálková, A., Adamcová, M., Šafratová, M., Jun, D., Opletal, L., Ločárek, M., & Macáková, K. (2015). Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*, 103, 192-196.
94. Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Passalacqua, N. G., Saab, A., Menichini, F., & Tundis, R. (2013). *Berberis aetnensis* and *B. libanotica*: a comparative study on the chemical composition, inhibitory effect on key enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), 1726-1735.
95. Tarrago, T., Kichik, N., Seguí, J., & Giralt, E. (2007). The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem*, 2(3), 354-359.

96. Carroll, C. M., & Li, Y. M. (2016). Physiological and pathological roles of the γ -secretase complex. *Brain Research Bulletin*, 126, 199-206.
97. Jiráček, R. (2010). Nové postupy v biologické terapii demencií. *Psychiatrie pro praxi*, 11(4), 143-144.
98. Lawton, G., & Witty, D. R. (2014). *Progress in medicinal chemistry* (Vol. 53, 103-104). Elsevier.
99. Ghosh, A. K., Kumaragurubaran, N., Hong, L., Koelsh, G., & Tang, J. (2008). Memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: drug development. *Current Alzheimer Research*, 5(2), 121-131.
100. MacLeod, R., Hillert, E. K., Cameron, R. T., & Baillie, G. S. (2015). The role and therapeutic targeting of α -, β -and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Science OA*, 1(3).
101. Alzforum [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://www.alzforum.org/therapeutics/timeline/app-and-amyloid-related>
102. Pharmacodia [online]. 2017 [cit. 2017-0211].
Dostupné z: <http://en.pharmacodia.com/web/basic/query?page=1&text.field=text&text.fieldShowName=Keyword&text.val=JNJ%2054861911&text.valShowName=JNJ%2054861911>
103. Erdogan Orhan, I. (2012). Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2252-2261.
104. Jia, Q., Deng, Y., & Qing, H. (2014). Potential therapeutic strategies for Alzheimer's disease targeting or beyond β -amyloid: insights from clinical trials. *BioMed Research International*, 2014, 1-22.
105. Martinez, A., Castro, A., Dorronsoro, I., & Alonso, M. (2002). Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Medicinal Research Reviews*, 22(4), 373-384.
106. 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.

107. del Ser, T., Steinwachs, K. C., Gertz, H. J., Andres, M. V., Gomez-Carrillo, B., Medina, M., Vericat, J. A., Redondo, P., Fleet, D., & León, T. (2013). Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *Journal of Alzheimer's Disease*, *33*(1), 205-215.
108. Martinez, A., & Perez, D. I. (2008). GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease?. *Journal of Alzheimer's Disease*, *15*(2), 181-191.
109. Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J. A., Nobel, M. E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, M., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, M., Eisendbrand, G., & Meijer, L. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, *1*(1), 60-67.
110. Opletal, L., Ločárek, M., Fraňková, A., Chlebek, J., Smíd, J., Hošťálková, A., Šafratová, M., Hulcová, D., Klouček, P., Rozkot, M., & Cahlíková, L. (2014). Antimicrobial activity of extracts and isoquinoline alkaloids of selected Papaveraceae plants. *Natural Product Communications*, *9*(12), 1709-1712.
111. Ločárek, M., Nováková, J., Klouček, P., Hošťálková, A., Kokoška, L., Gábrlová, L., Šafratová, M., Opletal, L., & Cahlíková, L. (2015). Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected Amaryllidaceae Species. *Natural Product Communications*, *10*(9), 1537-1540.
112. Havelek, R., Seifrtová, M., Královec, K., Bručková, L., Cahlíková, L., Dalecká, M., Vávrová, J., Řezáčová, M., Opletal, L., & Bílková, Z. (2014). The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, *21*, 479-490.
113. Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machadog M., Fontinhag D., Prudênciog M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., & Cahlíková L. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*, accepted manuscript.
114. Jegorov, A., Buchta, M., Sedmera, P., Kuzma, M., & Havlicek, V. (2006). Accurate product ion mass spectra of galanthamine derivatives. *Journal of Mass Spectrometry*, *41*(4), 544-548.

115. Lamoral-Theys, D., Andolfi, A., Van Goietsenoven, G., Cimmino, A., Le Calvé, B., Wauthoz, N., Mégalizzi, V., Gras, T., Bruyere, C., Dubois, J., Mathieu, V., Kornienko, A., Kiss, R., & Evidente, A. (2009). Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure–activity relationship and mechanistic insight. *Journal of medicinal chemistry*, 52(20), 6244-6256.
116. Roberts, J. D., Crain Jr, W. O., & Wildman, W. C. (1971). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of nicotine, quinine, and some Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 93(4), 990-994.
117. Mason, L. H., Puschett, E. R., & Wildman, W. C. (1955). Alkaloids of the Amaryllidaceae. IV. Crystalline Alkaloids of *Ammocharis coranica* (Ker-Gawl.) Herb., *Brunsvigia rosea* (Lam.) Hannibal and two *Crinum* Species. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1253-1256.
118. Sourmaghi, M. S., Azadi, B., Amin, G., Amini, M., & Sharifzadeh, M. (2010). The first phytochemical report of *Galanthus transcaucasicus* Fomin. *DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 18(2), 124.
119. Pubchem, Open Chemistry Database [online]. 2017 [cit. 2017-0809].
Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caranine#section=Names-and-Identifiers>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAs	Amaryllidaceae alkaloids (amarylkovité alkaloidy)
A β	Beta-amyloid
Ach	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba
AGEs	Advanced glycation endproducts
AMPA	α Amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazolpropionátový receptor
APG	Angiosperm Phylogeny Group
Apo-E	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein
BACE1	Beta site APP cleaving enzyme (β -sekretasa)
BuChE	Butyrylcholinesteráza
Ca3H	Kumarát-3-hydroxyláza
Ca4H	Cinnamát-4-hydroxyláza
cdk5	Cyklin dependentní kináza
cHx	Cyklohexan
CNS	Centrální nervová soustava
CTF	C-terminální fragment
cv.	Pěstovaná odrůda (kultivar)
DEA	Diethylamin
3,4-DHBA	3,4 dihydroxybenzaldehydu
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
G1	Monomerní globulární forma cholinesterázy
G2	Dimerní globulární forma cholinesterázy
G4	Tetramerní globulární forma cholinesterázy
GC	Plynová chromatografie
GSK3 β	Glykogensyntáza-kináza 3 beta
HEB	Hematoencefaliská bariéra
IC	Inhibiční koncentrace

IDE	Inzulin-degradující enzym
IP3	Inositoltrifosfát
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
NFT	Neurofibrillary tangles
NMDA	N-Methyl-D-aspartátový receptor
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PAL	Fenylalanin-lyáza
PCA	Principal Component Analysis (analýza hlavních komponent)
POP	Prolyl oligopeptidasa
PRAR γ	Receptory γ aktivované proliferátory peroxizomů
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
sAPP α	Solubilní APP po štěpení α -sekretasou
sAPP β	Solubilní APP po štěpení β -sekretasou
SERT	Serotonine transporter
TNF α	Tumor nekrotizační faktor alfa
To	Toulen
TYDC	Tyrosin dekarboxyláza
UV	ultrafialový

ABSTRAKT

Kohelová E: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. II

Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2017, 77s.

Předmětem diplomové práce byla příprava alkaloidního extraktu z rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, za účelem izolace 2 alkaloidů v čistém stavu metodou sloupcové chromatografie a následně metodou preparativní tenkovrstvé chromatografie. Vzorky byly podrobeny strukturní MS a NMR analýze a testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám (AChE a BuChE), na cytotoxickou aktivitu. Ve spolupráci s Fakultou agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů na České zemědělské univerzitě v Praze, byly měřeny aktivity antifungální, antimikrobiální a ve spolupráci s Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa Portugal byla stanovena aktivita antimalarická. Izolované látky byly identifikovány jako galanthamin, karanin a pluviin. Pluvin byl izolován v množství umožňující pouze strukturní analýzu.

Při testu na stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity karaninu byly získány následující hodnoty: $IC_{50, HuAChE} = 320 \pm 42 \mu M$ a $IC_{50, HuBuChE} = 486 \pm 56 \mu M$. Jako standard byl použit galanthamin ($IC_{50, HuAChE} = 1,71 \pm 0,07 \mu M$, $IC_{50, HuBuChE} = 42,30 \pm 1,30 \mu M$).

Při testu na stanovení inhibiční aktivity vůči POP byly pro karanin naměřeny tyto hodnoty: $IC_{50} > 1000 \text{ mM}$, pro galanthamin: $IC_{50} > 1000 \text{ mM}$. Jako standardy byly použity Z-Pro-prolinal ($IC_{50} = 3,27 \cdot 10^{-6} \text{ mM}$) a berberin ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$).

Při testu na stanovení cytotoxické aktivity vůči dvěma liniím buněk kolorektálního adenokarcinomu s mutací p53 (Caco-2 a HT-29) byly získány hodnoty pro karanin: $IC_{50, Caco-2} = 64,43 \pm 4,48 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = 46,56 \pm 1,81 \mu M$; galanthamin: $IC_{50, Caco-2} = 61,43 \pm 1,56 \mu M$. Jako standard byl použit vinorelbin ($IC_{50, Caco-2} = 0,03 \pm 0,00 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = \text{NT}$).

Karanin ani galanthamin nevykazovaly zajímavou antifungální, antibakteriální ani antimalarickou aktivitu.

Klíčová slova: *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Amaryllidaceae, Alzheimerova choroba, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, karanin, galanthamin pluvin

ABSTRACT

Kohelová E: Alkaloids of Amaryllidaceae family: isolation, structural identification, biological activity. II

Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2017, 77p.

The aim of the diploma thesis was a preparation of alkaloidal extract from fresh bulbs of *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN to isolate two Amaryllidaceae alkaloids by column and thin layer chromatography. Subsequently these alkaloids were subjected to structural MS and NMR analysis and tested for biological activity against human cholinesterases (HuAChE and HuBuChE) and for cytotoxic activity. In cooperation with the Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, antifungal and antimicrobial activities of alkaloids were tested, and in cooperation with Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa Portugal antimalarial activity of alkaloids was studied. Isolated substances were identified as galanthamine, caranine and pluviine. Pluviine was isolated in an amount allowing only structural analysis.

In the test for determining cholinesterase inhibitory activity of caranine the following values were obtained: $IC_{50, HuAChE} = 320 \pm 42 \mu M$ a $IC_{50, HuBuChE} = 486 \pm 56 \mu M$. Galanthamine ($IC_{50, HuAChE} = 1,71 \pm 0,07 \mu M$, $IC_{50, HuBuChE} = 42,30 \pm 1,30 \mu M$), was used as a positive control.

In the test for determining of prolyl oligopeptidase inhibitory activity of galanthamine and caranine the following values were measured; galanthamine: $IC_{50} > 1000 \text{ mM}$, caranine: $IC_{50} > 1000 \text{ mM}$. Z-Pro-prolinal ($IC_{50} = 3,27 * 10^{-6} \text{ mM}$) and berberine ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$) were used as positive control.

In the test for determining cytotoxic activity of galanthamine and caranine the following values were obtained; galanthamine: $IC_{50, Caco-2} = 61,43 \pm 1,56 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = 49,27 \pm 2,38 \mu M$, caranine: $IC_{50, Caco-2} = 64,43 \pm 4,48 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = 46,56 \pm 1,81 \mu M$. Vinorelbine ($IC_{50, Caco-2} = 0,03 \pm 0,00 \mu M$, $IC_{50, HT-29} = \text{NT}$) was used as positive control. For cytotoxicity assays were used colon epithelial cell lines, Caco-2 and HT-29.

In the test for determining antifungal, antimicrobial and antimalarial activity of galanthamine and caranine, no interesting values were measured.

Keywords: *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Amaryllidaceae, Alzheimer disease, acetylcholinesterase, caranine, galanthamine, pluviine