

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin II.

Alkaloidy *Narcissus jonquilla* L.

The biological activity of plant secondary metabolites II.

Alkaloids of *Narcissus Jonquilla* L.

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

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Ločárek

Hradec Králové, 2015

Lukáš Jílek

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2015

.....

jméno, příjmení

Chtěl bych velice rád poděkovat mému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Miroslavu Ločárkovi, za jeho ochotu, trpělivost, cenné rady při práci v laboratoři a za poskytnutí materiálů, které dopomohly k vypracování této diplomové práce. Rád bych také poděkoval panu PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za změřeni biologických aktivit alkaloidních extraktů. Na závěr bych chtěl poděkovat všem členům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za jejich kolegiální přístup, vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při řešení problémů v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1	Alzheimerova choroba.....	12
3.1.1	Klinický obraz.....	12
3.1.2	Etiopatogeneze.....	13
3.1.3	Farmakologická léčba AD v dnešní době.....	19
3.2	Čeleď Amaryllidaceae	26
3.2.1	Taxonomické zařazení	26
3.2.2	Morfologická charakteristika.....	26
3.2.3	Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	27
3.2.4	Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	27
3.2.5	Klasifikace alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	29
3.2.6	Rod <i>Narcissus</i>	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Všeobecné postupy	40
4.1.1	Destilace	40
4.1.2	Odpařování	40
4.2	Materiál a vybavení pro přípravu extraktů.....	40
4.2.1	Rozpouštědla	40
4.2.2	Chemikálie	40
4.3	Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza	41
4.3.1	Rostlinný materiál.....	41
4.3.2	Extrakce drogy a zpracování extraktu	41
4.3.3	GC/MS analýza a identifikace alkaloidů	42
4.4	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE	42
4.4.3	Chemikálie, pufrý, materiál, přístrojové vybavení a podmínky stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	42
4.4.4	Příprava biologického materiálu.....	44
4.4.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC50).....	44
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
5.1	GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Bella Estrella a jeho biologická aktivita	47

5.2 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Bell Song a jeho biologická aktivita.....	49
5.3 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Dick Sichel a jeho biologická aktivita.....	51
5.4 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Fruit Cup a jeho biologická aktivita.....	53
5.5 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Hill Star a jeho biologická aktivita.....	55
5.6 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Chit Chat a jeho biologická aktivita.....	57
5.7 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin <i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Martinette a jeho biologická aktivita.....	59
5.8 Strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů	61
5.9 Přehled biologické aktivity alkaloidních extraktů <i>Narcissus jonquilla</i>	63
6 ZÁVĚR	64
7 SEZNAM ZKRATEK	66
8 LITERATURA.....	68

ABSTRAKT

1 ÚVOD

Již na počátku své historie poznali lidé, žijící v těsném styku s přírodou a v přímé závislosti na ní, že některé rostliny pomáhají navracet zdraví, jiné že je naopak mohou ohrožovat. O léčivých rostlinách se píše již v nejstarších pramenech ze 4. tisíciletí př. n. l. Během doby se samozřejmě měnil jak výběr léčivých rostlin, tak i způsob jejich užití. V dnešní době využíváme látek obsažených v rostlinách a schopných ovlivňovat životní pochody v lidském těle.

Mezi jedny z účinných látek obsažených v rostlinách patří tzv., sekundární metabolity, konkrétně alkaloidy. Jedná se o heterocyklické dusíkaté báze produkované zpravidla rostlinami. Alkaloidy jsou většinou tuhé, bezbarvé, ve vodě málo rozpustné látky lipofilního charakteru a mají schopnost vytvářet s kyselinami ve vodě rozpustné soli, protože mají alkalický charakter. Atom dusíku obsažený v heterocyklickém kruhu je odvozen od aminokyseliny L-ornitinu, L-lysinu, L-tyrosinu, L-histidinu, L-fenylalaninu a L-tryptofanu¹.

Čeď rostlin Amaryllidaceae je zajímavá nejenom pro okrasné účely, ale i pro vysoký obsah biologicky aktivních alkaloidů. Strukturně různorodých alkaloidů s různou biologickou aktivitou bylo z této čeledi izolováno přes 500. Domovinou rostlin této čeledi jsou tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky. V České Republice je možné nalézt zástupce této čeledi například v podobě narcisů (*Narcissus*), Sněženek (*Galanthus*) a bledulí (*Leucojum*). První lékařské využití rostlin čeledi Amaryllidaceae je datováno do dob 4. století před naším letopočtem, kdy Hippokrat z Kou použil extrakt z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze k léčbě nádorů v oblasti dělohy².

Jednou z nejčastějších forem způsobujících demenci je Alzheimerova choroba (AD). Jedná se o postupný a závažný neurodegenerativní proces, při kterém dochází k úbytku neuronů a acetylcholinu (Ach) v mozku. V průběhu AD dochází k produkci a ukládání patologického proteinu beta-amyloidu (Aβ). V současné době neznáme příčinu AD, a proto jí neumíme léčit kauzálně. Jediná dostupná léčba souvisí s ovlivněním jednotlivých patogenetických článků nemoci. Tento typ terapie sice AD nevyléčí, ale zpomalí průběh demence a zlepší život postižených. Terapie založená na důkazech spočívá v léčbě inhibitory mozkových cholinesteráz a léčbě inhibitory glutamátových receptorů typu NMDA memantinem³.

Zásadní roli v patologii AD hraje neurotransmitér acetylcholin (Ach). Acetylcholinergní systém je prvním neurotransmiterovým systémem, který je u AD postižen. Ach je v mozku odbouráván acetylcholinesterázou a butyrylcholinesterázou. V beta-amyloidních placích

postižených jedinců je výrazně zvýšené množství butyrylcholinesterázy oproti plakům zdravých jedinců, které postupně vznikají stářím. Různými mechanismy tedy dochází k nedostatku Ach v mozku a úmrtí neuronů⁴.

Jedním z nejvýznamnějších alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* užívaných v terapii AD je galanthamin. Galanthamin patří mezi selektivní a reverzibilní inhibitor enzymu acetylcholinesterázy. V čeledi *Amaryllidaceae* se ale také nacházejí další významné alkaloidy s různou inhibiční aktivitou vůči acetyl a butyrylcholinesterase, které si zajisté zaslouží důkladnější prozkoumání. Navíc některé alkaloidy vykazují i účinky cytotoxické, analgetické, antiflogistické, antibakteriální, antivirotické a antifungální⁵.

2 CÍL PRÁCE

Diplomová práce má za hlavní cíl zkoumání biologické aktivity sekundárních metabolitů rostliny *Narcissus Jonquilla*. Mezi hlavní cíle patří:

1. Příprava základního etanolového a alkaloidního extraktu z rostlinného materiálu vybraných zástupců rodu *Narcissus*.
2. Příprava vzorků pro biologické testování
3. GC/MS analýza alkaloidních extraktů a identifikace alkaloidů
4. Stanovení biologické aktivity (inhibice lidské acetyl a sérové butyrylcholinesterázy) alkaloidních extraktů

Tato diplomová práce navazuje na výzkum katedry farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Práce vychází z činnosti pracovní skupiny ADINACO, která se zabývá izolací obsahových látek vybraných alkaloidních rostlin a sledováním jejich biologické aktivity.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Nejčastějším a nejcharakterističtějším onemocněním vedoucím k demenci je AD. Objev AD se datuje k roku 1907, kdy německý psychiatr Alois Alzheimer popsal na své pacientce charakteristické symptomy onemocnění mozku⁶.

AD je charakterizována úbytkem počtu neuronů v oblasti bazálního telencephala a v oblasti bazální kůry. Změna počtu neuronů v důsledku atrofie se do jisté míry překrývá s normálním obrazem procesu stárnutí, ale u AD jsou tyto změny výrazně rozsáhlejší než u normálního procesu stárnutí⁷.

V České Republice AD trpí přibližně 70 000 jedinců, ovšem přesné statistiky neexistují. AD zahrnuje přes 50 % všech demencí. Její výskyt se rapidně zvyšuje se stoupajícím věkem populace. Incidence se zdvojnásobuje každých 5 let po 65. roce života. Do 45. roku života je AD poměrně vzácné onemocnění. S postupným prodlužováním lidského života začíná být AD významným zdravotnickým, ale i socioekonomickým problémem⁸.

3.1.1 Klinický obraz

AD je onemocnění, které se vyvíjí nenápadně, pomalu a plíživě a zpočátku je velice těžce rozpoznatelné. AD lze rozdělit do tří stadií dle tíže ztráty paměti a soběstačnosti. V časných stádiích onemocnění předchází manifestnímu rozvoji demence bezpříznakové období, kdy aktivací latentní mozkové rezervy jsou ještě zajištěny normální kognitivní funkce. Ovšem postupně dochází k vyčerpání rezerv a objevují se kognitivní poruchy a snížení funkční výkonnosti, které si již uvědomuje sám nemocný i jeho okolí⁹.

AD lze rozdělit do tří stadií dle tíže ztráty paměti a soběstačnosti. V počátečním stadiu dochází k poruše učení se novým informacím, pacient si obtížně vybavuje aktuální informace, hledá odložené předměty a zapomíná dělat běžné úkony. Pacient zůstává soběstačný. Ve středním stadiu se prohlubuje deficit paměti, kdy si pacient vybaví jen hluboce vštípené informace. Pacient je dezorientovaný, nevybavuje si, kde je, kde bydlí, jména blízkých apod. Soběstačnost je vážně narušena. V těžkém stadiu (7–14 let od počátku onemocnění) je téměř úplná ztráta paměti, pacient si vybaví jen kusé útržky informací a novému se nedokáže naučit ani na chvíli. Pacient nepoznává ani blízké osoby a je nesoběstačný⁹.

Kromě paměti jsou postiženy i jiné kognitivní funkce, jako například poruchy prostorové orientace. Na konec se objeví kombinace symptomů afázie-apraxie-agnózie. Mění se osobnost, chování (agitovanost, úzkost, agresivita), poruchy emotivity. Mohou se objevit psychotické projevy (halucinace, bludy), Parkinsonský syndrom, poruchy chůze, či epileptické záchvaty. AD má plynule progredující charakter. Onemocnění končí letálně. Pacient přežívá v průměru 5–8 let⁹.

3.1.2 Etiopatogeneze

Přesná příčina a mechanismy AD prozatím nejsou objasněny. Velkou roli v onemocnění hrají i genetické faktory. V současné době objasňuje vznik AD několik teorií.

3.1.2.1 β -amyloidní teorie

Jednou z nejvýznamnějších rolí vzniku AD hraje ukládání depozit β – amyloidu ($A\beta$) v mozkové tkáni. Toxický protein $A\beta$ vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za normálních podmínek štěpen enzymem α -sekretázou na fragmenty o 39-40 aminokyselinách. Tyto fragmenty mají pravděpodobně neuroprotektivní funkci a zároveň se podílejí na neuroplasticitě a paměťových mechanismech. Za patologických podmínek je však APP štěpen β a γ -sekretázou na delší fragmenty o 42, popřípadě 43 aminokyselinách. Tyto fragmenty nejsou solubilní, koagulují a polymerují v extracelulárních prostorech na β -amyloid. $A\beta$ se ukládá v neuropilu kde vytváří tzv. Alzheimerovské plaky (neuritické plaky). V oblasti plaků dochází k neurodegeneraci s odumíráním neuronů, tvorbě gliového lemu a sterilnímu zánětu¹².

3.1.2.2 Teorie τ -proteinu

Za normálního fyziologického stavu se τ -protein v defosforylovaném nebo částečně fosforylovaném stavu váže na mikrotubuly, které zpevňuje a zároveň má důležitou funkci v axonálním transportu. Za patologických okolností jsou z τ -proteinu odštěpovány krajní aminokyseliny a je hyperfosforylován. Hyperfosforylovaný τ -protein se postupně zkracuje, je nerozpustný a je spojen do párových helixů. Takto pozměněný τ -protein vytváří v neuronech

tzv. neurofibrilární tangles (uzlíčky, košíčky). Intracelullární depozice neurofibrilárních plaků může narušit cytoarchitektoniku buňky a tím způsobit její smrt¹².

3.1.2.3 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je po věku druhý nejdůležitější rizikový faktor. ApoE je protein tvořený 299 aminokyselinami o molekulové hmotnosti 33Kda. Je součástí několika plazmatických lipoproteinů. ApoE se podílí na tvorbě β -amyloidu, ukládá se v neuritických placích, neurofibrilárních uzlíčkách i vaskulárním amyloidu. Gen pro ApoE je polymorfní, vyskytuje se ve třech alelách, které kodují vznik tří rozdílných izoform ApoE2, ApoE3 a ApoE4. ApoE zvyšuje riziko vzniku sporadické formy AN a dědičné formy s pozdním začátkem. U lidí bez alel pro ApoE4 je riziko vzniku AN během života asi 9 %, u heterozygotů 29 %, u homozygotů je to už ale 83 %¹³.

3.1.2.3 Oxidační stres a volné radikály

Na neuronální degeneraci se podílí i reaktivní kyslíkové formy (ROS), kyslíkové radikály, které vedou k peroxidaci lipidů buněčné membrány a k poškození mitochondriálních funkcí. Produkce ROS je za normálních fyziologických funkcí řízena antioxidanty. Ovšem následkem vyššího věku, chorobným procesem nebo jiným faktorem může dojít k tomu, že hladina ROS překročí antioxidační aktivitu a dojde ke vzniku oxidačního stresu¹⁴.

Volné radikály jsou atomy nebo molekuly, které nesou nepárový elektron. Vznikají jako vedlejší produkt oxidačních a redukčních reakcí. Jedná se vysoce reaktivní molekuly, které potřebují ke své stabilizaci elektron, který získávají ze sousedních molekul. Následkem těchto reakcí dochází k významnému poškození molekul DNA, proteinu, lipidů buněčných membrán a ke spuštění řetězové peroxidace lipidů. Redukcí molekulárního kyslíku na vodu v průběhu oxidativní fosforylace dojde k tvorbě peroxidového radikálu, peroxidu vodíku a obzvláště reaktivního hydroxylového radikálu. Tvorbu volných radikálů potlačuje řada antioxidantů, jako například α -tokoferol nebo kyselina askorbová¹⁵.

3.1.2.4 Cholinergní teorie

Pří AD bývá jako první neurotransmiterový systém postižen acetylcholinergní. Mozek pacientů s AD trpí velkým deficitem acetylcholinu (Ach). Ach je jedním z hlavních neuromediátorů v celém centrálním nervovém systému. Ach přenáší vzruchy na nervosvalové ploténce, v parasymptatiku a v cholinergních drahách CNS a zároveň hraje významnou roli v procesu učení. Acetylcholinergní systém je nezbytný pro paměťové mechanismy, zejména pro krátkodobou paměť a konsolidaci. Poškození přenosu vzruchů přes cholinergní synapse vede k poruše kognitivních a behaviorálních funkcí a k celkovému rozpadu osobnosti¹⁶.

Enzymy, které katalyzují hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou se nazývají cholinesterázy. Tato reakce je nezbytná k tomu, aby se cholinergní neuron vrátil do původního stavu. Existují dva typy cholinesteráz:

- 1) Acetylcholinesteráza (AChE) známá také jako erytrocytová cholinesteráza
- 2) Pseudocholinesteráza, též známá jako plazmová cholinesteráza nebo butyrylcholinesteráza (BuChE).

AChE je enzym vyskytující se v mozku, svalech a v malém množství i v erytrocytech. Jeho hlavní funkcí je ukončení nervového vzruchu na cholinergních synapsích tím, že rychle hydrolyzuje vyplavený acetylcholin na cholin a acetát. Působení acetylcholinu na postsynaptických receptorech je takto zastaveno. Během AD je sníženo uvolnění acetylcholinu z presynaptických zakončení. Dále bývá při AD přítomen deficit enzymu cholinacetyltransferázy, který syntetizuje Ach z cholinu a z acetylkoenzymu A. Je omezeno také zpětné vychytávání cholinu ze synaptické štěrbin¹⁷.

Dalším mechanismem, který přispívá k acetylcholinergnímu deficitu, je zvýšená tvorba BuChE, rovněž odbourávající acetylcholin, na jejíž tvorbě se podílejí aktivované gliové elementy v oblasti plaků. BuChE je obsažena primárně v játrech a ve stopovém množství v mozku. V mozku osob postižených AD je ve zvýšeném množství v oblastech A β plaků¹⁸.

Oba typy cholinesteráz existují, jako globulární monomery G1, dimery G2 nebo tetramery G4 v různých molekulárních formách. Fyziologická funkce cholinesteráz je pravděpodobně zprostředkovaná tetramerní formou G4. AChE se v lidském mozku vyskytuje převážně, jako tetramer G4 a minoritní monomer G1. G1 isoforma BuChE vykazuje

v průběhu AD 30–60% zvýšení, zatímco hladina G4 formy klesá, nebo zůstává stejná jako ve zdravém mozku¹⁹.

3.1.2.5 Nadměrná excitace NMDA receptorů

Dalším postiženým neurotransmitterovým systémem při AD je glutamátergní systém. Dochází k nadměrnému uvolnění excitačních aminokyselin glutamátu, aspartátu a v nejpostiženějších korových oblastech dochází ke sníženému zpětnému vychytávání glutamátu. Glutamát se tak nadměrně váže na ionotropní receptory NMDA (N-methyl-D-aspartátový receptor). Dochází pak k nadměrnému otevírání kalciových kanálů, ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů, k aktivaci proteinkináz a fosfatáz a k následné kaskádě dějů, mezi něž patří zvýšení exprese některých nežádoucích genů, a v konečném důsledku k neuronální apoptóze. Navíc NMDA-receptory realizují jeden ze základních dějů učení – dlouhodobou potenciaci, tento mechanismus je hyperexcitací NMDA-receptorů rušen²⁰.

3.1.2.6 Zánět

Výše zmíněné procesy společně s oxidativním stresem spouštějí další mechanismy, které vedou ke vzniku sterilního zánětu v oblastech. V rámci akutní fáze zánětu dochází k transformaci mikroglíí a astrocytů v okolí neuronu na makrofágy, aktivuje se cyklooxygenáza 2 a je spuštěna syntéza prostaglandinu, uvolnění prozánětlivých cytokinů - interleukin 1, interleukin 6, TNF α a volných kyslíkových radikálů. Tyto mechanismy vyvolávají následně další neurodegenerativní změny²¹.

V blízkosti amyloidních depozit je vysoká míra exprese histokompatibilních antigenů druhé třídy (HLA-DR). V mikroglii se při AD vykazuje vysoký počet receptorů první třídy MHC (Major histocompatibility complex), C3 a C1q složek kompartmentu, interleukinu-1 a feritinu. Imunitně aktivované mononukleární fagocyty mohou vylučovat potenciálně neurotoxické cytokiny. Aktivace mikroglie se podílí na tvorbě senilních plaků a tím i na patogenezi AD²².

Adheze mikroglíí a monocytů na A β plaky je zprostředkována tzv. scavenger („vychytávače“) receptory typu A a kromě produkce prozánětlivých TNF α zvyšuje množství volných kyslíkových i dusíkatých radikálů (ROS, RNS). K zánětu, oxidativnímu stresu a neuronální dysfunkci vede i vazba A β na receptory produktů pokročilé glykace (receptors

for Advanced Glycation End-products). AGEs je skupinou různorodých látek a jejich produkce je zvýšena například důsledkem hyperglykémie při diabetu. Neurofibrilární klubka i extracelulární A β plaky jsou pro takovou glykaci substráty.

3.1.2.7 Amyloidová angiopatie

Vyskytuje se přibližně v 90 % případů AD. Pro AD není specifická. Můžeme jí nalézt i v průběhu klinicky normálního stárnutí, při Downově syndromu a v řadě dalších chorob, často bez závislosti na výskytu plaků a klubek²³.

3.1.2.8 Tvorba tagles

Neuronální klubka (tagles) jsou spirální vlákna s charakteristickou periodicitou. Hlavní součástí tagles je τ -protein, který je v asociaci s neuronálními mikrotubuly. V tagles se vyskytuje v jednodušší izoformě a s vyšší molekulární hmotností způsobenou hyperfosforylací. Na vzniku tagles se podílí i glykozylace a ubikvitinizace prostřednictvím proteinkinasy glykogensyntázakináza-3 β ²⁴.

3.1.2.9 Nedostatek neurotrofních faktorů

U AD byl zjištěn nedostatek některých antiapoptických faktorů a naopak nadbytek faktorů působících proapoptoticky. Byla například prokázána nižší produkce faktoru CREB (cAMP response element binding protein – protein vázající se v genomu na element zodpovědný za odezvu na cAMP), a v důsledku toho nižší tvorba nervového růstového faktoru BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Nervový růstový faktor patří do skupiny neurotrofních faktorů. Jedná se o malou skupinu aktivních proteinů, které mají na starost udržení funkce a přežití nervových populací. Jejich funkce spočívá v kontrole růstu axonu, regeneraci poškozeného neuronu a hrají i klíčovou roli při tvorbě paměti. Obdobně dochází ke snížené tvorbě dalších nervových růstových faktorů. Vyskytuje se však také úbytek receptorů pro nervové růstové faktory (TrK-receptory – receptory aktivující tyrozinkinázu), což dále vede ke snížení neuronální plasticity – ke snížené tvorbě dendritických trnů, nových synapsí, nových neuronových okruhů. Pravděpodobně také dochází ke snížení neurogeneze.

Nervový růstový faktor je důležitý pro přežití cholinergních neuronů. Jeho nedostatek tedy vede ke snížení počtu cholinergních neuronů, ale také i ke snížení tvorby cholinacetyltransferázy, což ve výsledku způsobí snížení cholinergní transmise²⁵.

3.1.2.10 Mitochondriální dysfunkce

Porucha mitochondriální funkce je způsobena oxidačním stresem, při kterém vzniká nadměrné množství ROS a RNS. Za fyziologicky normálních podmínek při mitochondriálním buněčném dýchání vznikají také ROS a RNS, ovšem tělu vlastní antioxidační mechanismy je dokáží udržet na přijatelné úrovni. Oxidační stres tedy způsobuje poškození mitochondriální DNA, mitochondriální funkce a poškození buněčných membrán. V blízkosti mitochondrií se nachází endoplazmatické retikulum, kde amyloidní cestou vzniká A β a spolupráce těchto dvou organel je tedy narušena. Další změny bývají zjišťovány v mitochondriích, na úrovni enzymů dýchacích řetězců, což má za následek sníženou tvorbu makroergních vazeb, menší energetickou suplementaci mozku²⁵.

3.1.3.11 Genetika

AD je heterogenní onemocnění. Fenotypicky se rozlišují dvě základní podoby: ranní forma (presenilní forma) a pozdní forma. U presenilních forem se objevují mutace na druhém raménku 21. chromozomu, který obsahuje gen pro APP. Byly zjištěny mutace na 1. a 14. chromozomu, v oblastech kódujících preseniliny - geny pro transmembránový protein presenilin 1, respektive presenilin 2 - součást enzymů γ sekretáz. Preseniliny jsou transmembránové proteiny, které za patologických okolností interagují s APP a podílí se na tvorbě β -amyloidu²⁶. Dále je zkoumán gen pro ApoE4 a tzv. SORL1 gen, který je asociován s formou s pozdním začátkem. Defekt v SORL1 genu a následně deficit funkčního produktu má za následek chybný intracelulární transport APP a formaci β -amyloidu. Genetických polymorfismů jako rizikových faktorů choroby je však více. V současné době je sledována řada genetických faktorů a je snaha nalézt genetické podmínění AD²⁷.

3.1.3 Farmakologická léčba AD v dnešní době

V současné době prozatím není zcela objasněna etiologie AD, což neumožňuje optimální léčebný postup – kauzální terapii. Je ovšem známo více etiopatogenetických mechanismů onemocnění, které spolu vzájemně souvisejí. Právě na tyto mechanismy je zacílená současná terapie, která dokáže AD zpomalit, především když se s léčbou začne včas.

Terapie AD má být komplexní sestávající z biologické (především farmakoterapie) a nebiologické léčby – kognitivní trénink a další behaviorální postupy. Kauzální léčiva současně nejsou dostupná, jedná se pouze o léčbu symptomatickou.

V klinickém užívání jsou pouze dvě skupiny látek, jejichž použití je založeno na důkazech (evidence-based medicine). Jedná se o inhibitory cholinesteráz a inhibitory NMDA receptorů. Od podání farmak z těchto dvou skupin očekáváme zpomalení progresu demence, oddálení těžkých stadií demence, oddálení doby, kdy jsou postižení pacienti umísťováni do léčebných zařízení nebo do zařízení sociální péče.

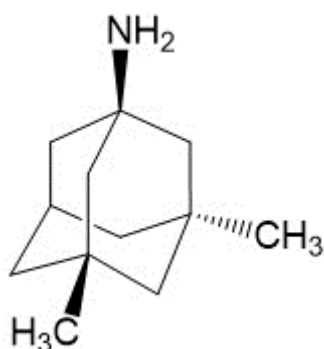
Léčiva ovlivňující AD můžeme rozdělit i na léčiva ovlivňující kognitivní funkce - kognitiva a léčiva ovlivňující nekognitivní funkce. První skupinu reprezentují tzv. kognitiva - inhibitory mozkových acetyl- i butyrylcholinesteráz. Tyto látky zlepšují acetylcholinergní transmissi tím, že blokují enzymy, které acetylcholin odbourávají. Tyto látky jsou určeny pro lehké až střední demence na podkladě AD, ale studie prokázaly účinky i u těžkých alzheimerovských demencí. Mezi kognitiva patří i léčiva ovlivňující i jiné neuromediátorové systémy, mozkový metabolismus - nootropika, antioxidanty, standardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* a další. Léčiva ovlivňující nekognitivní funkce mají za úkol zlepšovat symptomatické a behaviorální příznaky, které doprovázejí AD - poruchy chování, poruchy spánku, emoční labilita a agitace. Jedná se o antidepresiva (hlavně SSRI), hypnotika, neuroleptika, anxiolytika a další²⁸.

3.1.3.1 Léčiva ovlivňující NMDA receptor

Hlavním zástupcem této skupiny je alkaloid memantin. Jedná se o jedinou léčivou látku, která je z této skupiny v současné době v ČR registrována. Je to nekompetitivní antagonist glutamátových N-Metyl-D-Aspartátových (NMDA) receptorů. Blokuje jejich chronickou hyperaktivaci a tím i zvýšený apoptózu-indukující vtok vápníku do neuronů, což je

považováno za jeden z patogenetických mechanismů u AD. Dalším významným mechanismem je přímá kompetitivní inhibice nadměrně stimulovaných hipokampálních NMDA receptorů, čímž preparát snižuje míru „nespecifického šumu“ stínícího zpracovávané informace²⁹.

Jeho účinnost byla prokázána randomizovanými placebem kontrolovanými studiemi u středně těžké až těžké AD. Efekt má lék jak v mono terapii, tak v kombinaci s donepezilem. Podává se perorálně v denní dávce 20 mg (jednorázově nebo rozdělený do dvou denních dávek), titruje se tak, že se podává první týden 5 mg a každý další týden se 5 mg přidává. Memantin je obecně dobře tolerovanou látkou. Výjimečně může obvykle na počátku podávání působit poruchy vnímání – halucinace, iluze³⁰.



Obr. 1: vzorec Memantinu

3.1.3.2 Inhibitory cholinesteras

U AD je nejvíce postižen acetylcholinergní systém. Postižen je především presynaptický oddíl neuronu, zatímco postsynaptický oddíl zůstává poměrně zachovalý. Přesto zůstává schopnost syntézy a uvolnění Ach do jisté míry zachována. Z tohoto faktu vychází základní farmakoterapeutické strategie.

Substituční terapie samotným Ach není možná, protože má velmi krátký poločas. Podávání cholinu se neosvědčilo pro jeho depresogenní efekt. Nejužívanější v substituční terapii jsou lecitiny - deriváty glycerolu se substituovaným fosfatidylcholinem a mastnými kyselinami. Z lecitinu se postupně uvolňuje cholin pro syntézu Ach. Používá se především sójový lecitin, který se nejčastěji používá v kombinační farmakoterapii s inhibitory acetylcholinesteráz³¹.

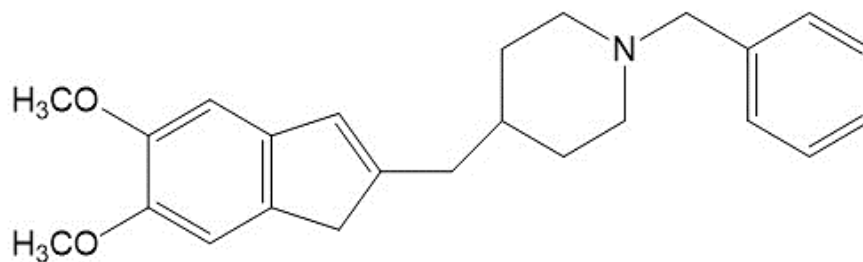
AchE je enzym odbourávající Ach v CNS, naopak BuChE převládá na periférii. Zablokováním tohoto odbourávajícího enzymu zvýšíme množství Ach schopného vazby na své receptory. U AD se navíc odbourávání Ach účastní butyrylcholinesteráza, jejíž molekuly jsou patologicky tvořeny aktivovanými gliovými elementy v oblasti plaků. I na tento enzym inhibitory působí.

Mechanismus inhibitorů cholinesteráz schválených pro terapii AD vychází z tzv. cholinergní teorie. U Alzheimerovy nemoci, ale i u jiných demencí dochází k progredující ztrátě cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti. Dochází zde k postižení všech částí cholinergního systému snížením hladin ACh, cholinacetyl transferázy, pomocí které je ACh syntetizován, a také k úbytku acetylcholinesterázy, pomocí které je ACh odbouráván po vyloučení do synaptické štěrbiny. Právě na inhibici AchE je cílena současná moderní terapie, jelikož je lépe snášena než přímá terapie agonisty ACh, navíc podporuje přirozené fázické uvolňování Ach³².

Účinnost iAChE byla prokázána mnoha randomizovanými placebem kontrolovanými studiemi. Prokázalo se, že jsou neúčinnější v terapii lehké a středně těžké demence a způsobují zpomalení progresy symptomů AD až o 5 let po nasazení. iAChE zlepšují nejen kognitivní funkce a funkční stav pacientů, ale také příznivě ovlivňují poruchy chování a psychické příznaky a to ve všech stádiích demence³³.

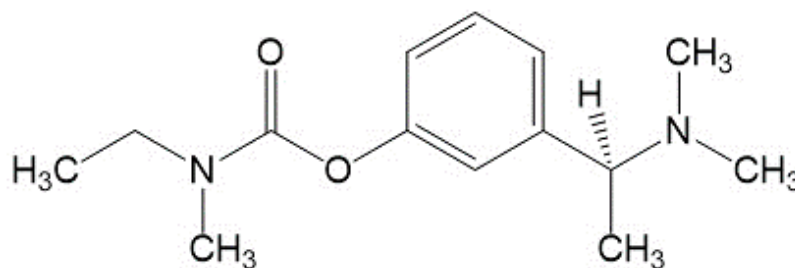
První látkou zavedenou do praxe byl fyzostigmin s krátkým biologickým poločasem. V současnosti jsou v ČR dostupné 3 inhibitory AchE – donepezil, rivastigmin a galantamin. Jedná se o látky s dlouhým biologickým poločasem a dobrou tolerancí³⁴.

- **Donepezil** (Aricept®) je piperidinový derivát a poměrně velmi čistý inhibitor acetylcholinesteráz bez podstatného ovlivnění butyrylcholinesteráz. Je obecně velmi dobře tolerován, má dlouhý poločas odbourávání (více než 70 hodin), což umožňuje podání 1krát denně. Obvyklé dávkovací schéma je první měsíc 1krát denně 5 mg perorálně, při dobré toleranci od druhého měsíce 1krát 10 mg/den. Řada klinických studií zjistila účinnost donepezilu také u některých non-alzheimerovských demencí (vaskulární, parkinsonské demence), kde však není hrazen zdravotními pojišťovnami ČR³⁵.



Obr. 2: vzorec Donepezilu

• **Rivastigmin** (Exelon®) je karbamátový derivát, který reverzibilně inhibuje jak acetyl-
tak i butyrylcholinesterázu. Při perorálním podání je nutné dávkování 2krát denně. Dávka se
titruje tak, že první měsíc se podává 2krát denně 1,5 mg, druhý měsíc 2krát denně 3,0 mg,
třetí měsíc 2krát 4,5 mg a dále 2krát 6,0 mg/den. Rivastigmin je aplikovat formou
transdermální náplasti. Výhodou této lékové formy je jednorázové denní podání a rychlá
titrace dávky, která probíhá tak, že první měsíc odpovídá denní dávka získaná z náplasti
přibližně 5 mg, druhý měsíc přibližně 10 mg. Tím, že je obcházen gastrointestinální trakt, jsou
minimalizovány gastrointestinální nežádoucí účinky. Navíc je hladina léčiva v krvi udržována
plynuleji, bez větších výkyvů. Rivastigmin je kromě Alzheimerovy choroby (včetně varianty
s Lewyho tělísky, kde dobře ovlivňuje psychotické příznaky) určen také k terapii demence
u Parkinsonovy choroby³⁶.



Obr. 3: vzorec Rivastigminu

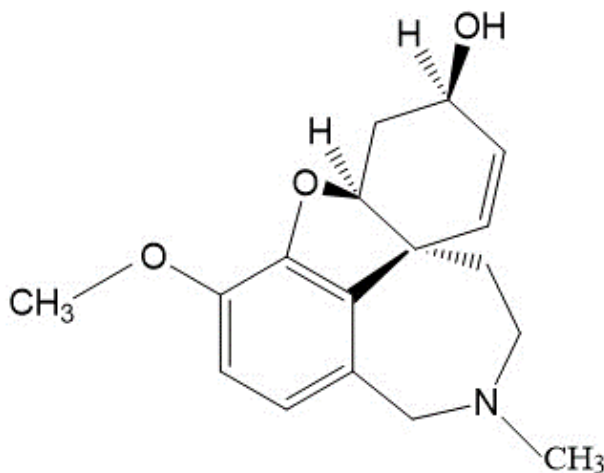
• **Galantamin** (Reminyl®) je fenantrenový terciární alkaloid izolovaný ze sněženky
Galanthus woronowii, vyskytující se i v ostatních druzích rodu *Galanthus* (v ČR sněženka
podsněžník – *Galanthus nivalis*), ale i v mnoha dalších rodech čeledi *Amaryllidaceae*.

Galantamin byl jednou z prvních látek používaných k terapii myasthenia gravis
a paralytické poliomyelitidy. Další schopností galantaminu je odstraňovat svalovou paralýzu
navozenou tubokurarinem a antagonizovat dechový útlum navozený opioidy. Rovněž

antagonizuje centrální anticholinergní syndrom způsobený hyoscinem a potlačuje některé centrální účinky droperidolu a diazepamu³⁷.

Galanthamin je selektivní, reverzibilní, kompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy a allosterický modulátor nikotinových receptorů. Podává se 1krát nebo 2krát denně, titrace probíhá tak, že první měsíc je podáváno per os 8 mg (2krát denně 4 mg), druhý měsíc 16 mg (2krát denně 8 mg) a od třetího měsíce 24 mg (2krát denně 12 mg). Tolerance galantaminu je obecně dobrá³⁸.

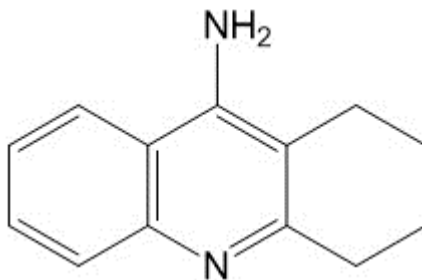
Výhoda galantaminu oproti ostatním iAChE používaným v terapii AD spočívá v jeho schopnosti alostericky modulovat nikotinové receptory, což zároveň zvyšuje produkci Ach. Jeho nevýhodou je velmi malá účinnost proti BuChE³⁹. Galantamin je již delší dobu užíván v terapii AD a je dostatečně prozkoumán. V současné době je ve vědeckých studiích používán jako standard AChE inhibiční aktivity a ostatní potenciální léčiva jsou s ním srovnávána.



Obr. 4: vzorec Galantaminu

- **Takrin** (THA neboli tetrahydroaminoakridin) je centrálně působícím nekompetitivním reverzibilním inhibitorem AChE a BuChE, čímž zabraňuje degradaci a metabolismu Ach, což zapříčiňuje jeho zvýšenou hladinu v synaptické štěrbině⁴⁰. Biologická dostupnost takrinu je 17 %, současná konzumace takrinu s jídlem snižuje jeho dostupnost o 30-40%. Biologický poločas je okolo 2-4 hodin. Vzhledem k možnému reverzibilnímu narušení jaterních funkcí během užívání takrinu, je doporučována souběžná konzumace vitamínu C. Ten snižuje vznik substancí poškozujících buňky při metabolismu takrinu v lidském těle. Také vyšší dávky lecitinu, dosahující až 35g denně, napomáhají snižovat nežádoucí účinky takrinu.

Nevýhodou je, že pouze čtvrtina pacientů toleruje terapeutické dávky takrinu. Objevují se nežádoucí účinky jako je nauzea, průjmy a elevované jaterní enzymy. Pro své nežádoucí účinky (zejména hepatotoxicitě) se u nás takrin již nepoužívá⁴¹.



Obr. 5: vzorec Takrinu

V případech, kdy pacient netoleruje jeden z inhibitorů cholinesteráz nebo je léčba málo účinná, je možné převedení na jiný typ inhibitoru, ale účinnost by měla být hodnocena nejdříve po 3 měsících podávání. Ke kontraindikacím užívání inhibitorů acetylcholinesteráz patří aktivní vředová choroba gastroduodenální a těžší převodní poruchy srdce, opatrnosti je zapotřebí i u sinusové bradykardie. Hlavní nežádoucí účinky jsou gastrointestinální – nechutenství, dyspepsie, nauzea, výjimečně zvracení, obvykle na počátku podávání a v průběhu titrace dávky.

Spektrum látek používaných v klinické terapii AD je poměrně úzké, proto se hledají další potencionální léčiva a to i mezi látkami přírodního původu. Například Huperzin A má silnější účinky a vykazuje výhodnější farmakokinetické vlastnosti než současně používaná léčiva.

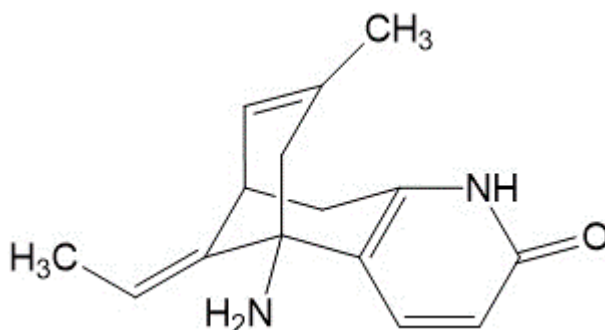
- **Huperzin A (HupA)** je seskviterpenový alkaloid izolovaný z plavuně *Huperzia serrata* z čeledi *Lycopodiaceae* a v malých koncentracích se vyskytuje i ve Vrancí jedlovém (*Huperzia selago*), který se vzácně vyskytuje i na našem území. Tento alkaloid působí jako silný selektivní reverzibilní iAChE a současně jako antagonist receptorů NMDA. V Číně je používán při terapii AD jako léčivo a je deklarován jako složka některých doplňků stravy i u nás. V současnosti není v USA a Evropě schválen jako léčivo pro AD.

Huperzia serrata byla po staletí užívána v tradiční čínské medicíně jako antipyretikum a antiflogistikum. Za tyto účinky jsou odpovědné značně toxické chinolizidinové alkaloidy. U izolovaného HupA však antipyretické a antiflogistické účinky chybí. HupA díky silné inhibici AChE vykazuje neuroprotektivní vlastnosti, zlepšuje paměť a proces učení, snižuje úzkost.

Vedlejšími účinky jsou nauzea, pocení, rozmazané vidění, ale intenzita těchto účinků je slabší než u galantaminu⁴¹.

Výhodou HupA je i to, že má delší působení než donepezil či rivastigmin a v některých studiích se ukazuje být i účinnější než zmíněná léčiva. Oproti galantaminu a ostatním používaným léčivům rychleji prostupuje přes hematoencefalickou bariéru a má lepší biologickou dostupnost při orálním podání. Jeho periferní cholinergní účinky jsou naopak nižší. Zajímavá je i velmi nízká terapeutická dávka – v řádech setin miligramu na den.

HupA je nyní klinicky testován. V USA byla úspěšně dokončena 2. fáze klinického testování a v Číně probíhá již 4. fáze, což znamená vstup do běžné klinické praxe a shromažďování dat o vedlejších účincích a účincích při dlouhodobém podávání. V posledních letech je výzkum zaměřen zejména na syntetické a semisyntetické analogy HupA v naději, že drobné změny struktury by mohly přinést ještě vyšší účinnost a výhodnější farmakokinetické vlastnosti. Totéž se týká i huperzinu B – alkaloidu izolovanému ze stejné rostliny. Sám o sobě má slabší inhibiční účinek než galantamin, ale jeho deriváty mají účinnost až o 2 řády vyšší⁴².



Obr. 6: vzorec Huperzinu A

3.2 Čeleď Amaryllidaceae

Čeleď rostlin Amaryllidaceae je zajímavá nejenom pro své okrasné účely, ale i pro vysoký obsah biologicky aktivních alkaloidů s různým efektem na lidský organismus. Byly popsány efekty cytotoxické, analgetické, antiflogistické, antibakteriální, antivirové, antifungální a schopnost ovlivňovat imunitní a centrální nervový systém. Tato čeleď zahrnuje okolo 130 rodů a více než 1300 odrůd rozšířených hlavně v tropech, subtropích a méně pak i v mírném pásu. Mezi nejvýznamnější rody patří: *Leucojum*, *Galanthus*, *Narcissus*, *Crinum*, *Amaryllis* a *Clivia*⁴³.

3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše:	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	Jednoděložné (<i>Liliopsida</i>)
Řád:	Chřestotvaré (<i>Asparagales</i>)
Čeleď:	Amarylkovité (<i>Amaryllidaceae</i>)
Rod:	<i>Narcissus</i> L.
Druh:	<i>Narcissus jonquilla</i> L.



Obr. 7: *Narcissus jonquilla* L.⁴³

3.2.2 Morfologická charakteristika

Rostliny této čeledi jsou vytrvalé pozemní suchomilné byliny s oddenkem, hlízou, vzácně s oddenky. Listy jsou jednoduché, přisedlé nebo řapíkaté, střídavé, uspořádané nejčastěji dvouřadě, vzácněji spirálně, s listovými pochvami. Květy jsou oboupohlavné, jednotlivé nebo v květenstvích, zpravidla vrcholících, okolících nebo hlávkách. Květy jsou pravidelné nebo nepravidelné, souměrné složené ze tří okvětních a tří kališních lístků. Plodem je tobolka nebo bobule⁴⁴.

3.2.3 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou k lékařským účelům využívány již tisíce let, ovšem poslední dobou jím je věnována pozornost pro vysoký obsah biologicky aktivních alkaloidů. První izolovaný alkaloid rostlin čeledi Amaryllidaceae byl lykorin získaný z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877. Do dnešní doby bylo strukturně různorodých alkaloidů s různou farmakologickou aktivitou z této čeledi popsáno přes 500. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, avšak v nejvyšším množství je nalezneme v cibuli⁴⁵.

Společným znakem alkaloidů této čeledi je typicky tetracyklické uspořádání s pěti- nebo šestičlenným kruhem obsahujícím atom dusíku. Některé mají ještě další kruh tvořený (-O-CH₂-O-) můstkem. Společným prekurzorem těchto alkaloidů je 15-ti uhlíkatá struktura norbelladinu, který je odvozen od aminokyseliny tyrosinu a fenylalaninu. Alkaloidy jsou klasifikovány podle svých strukturních vlastností do 9 hlavních skupin, které jsou pojmenovány dle svého hlavního zástupce. Jedná se o lykorin, krinin, haemanthamin, pankratistatin, galanthamin, tazettin, homolykorin, montanin a norbelladin⁴⁶.

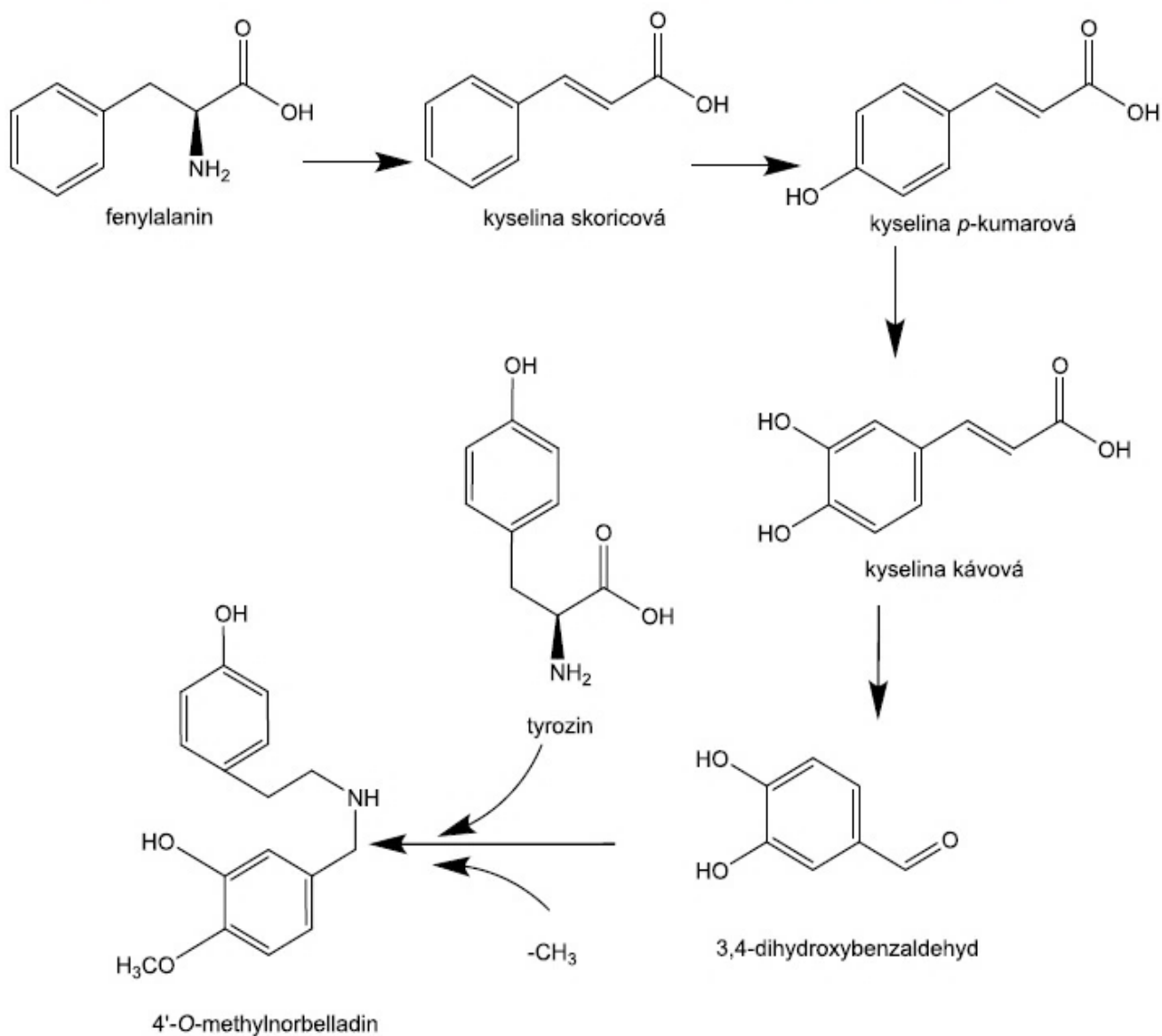
3.2.4 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

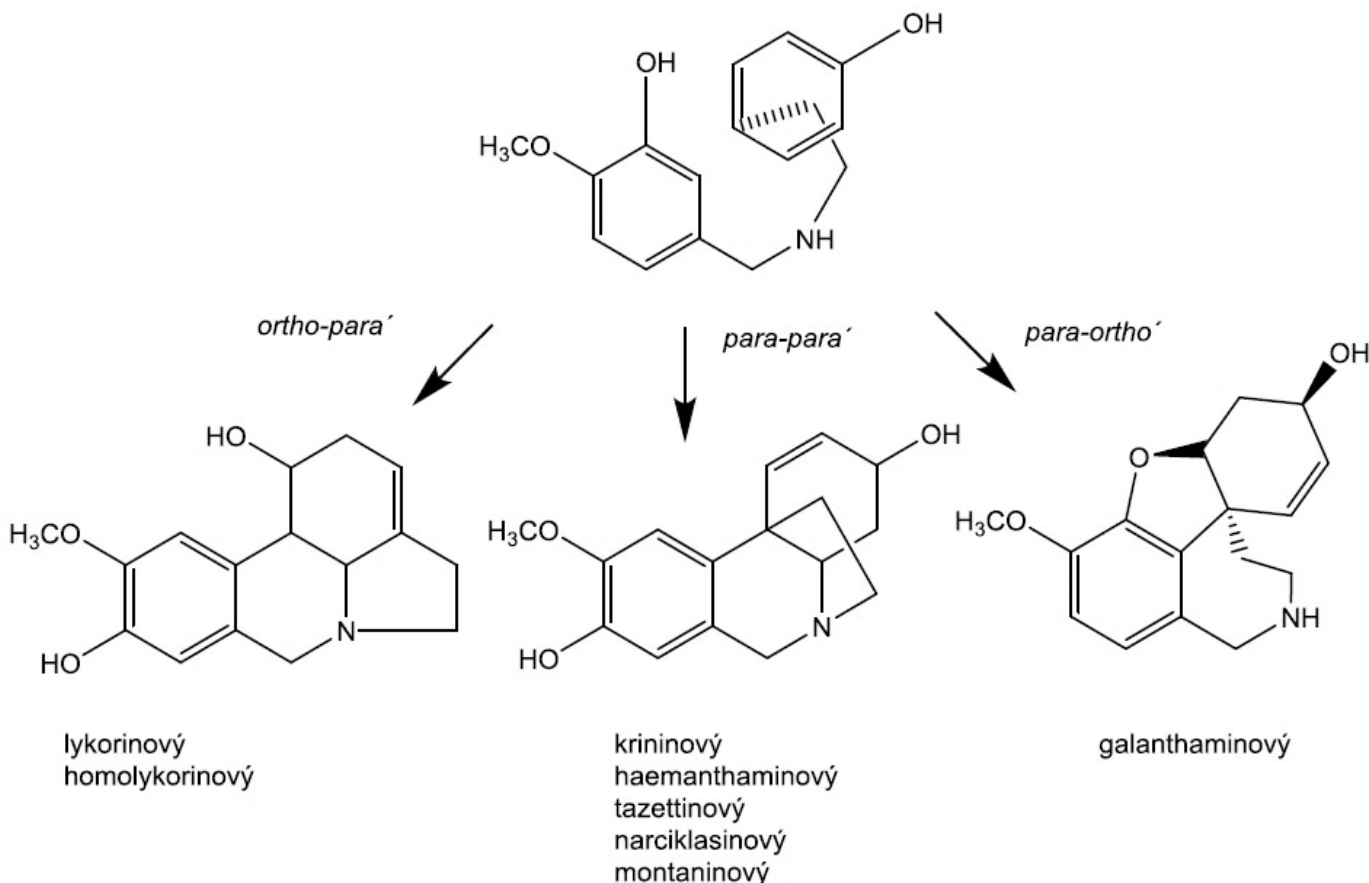
Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta, která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu. Tato cesta je specifická biosyntetická cesta pro vznik více než 400 alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae, zejména rodů *Crinum*, *Galanthus*, *Leucojum*, *Lycoris* a *Narcissus*⁴⁷.

L-Tyrosin je dekarboxylován tyrosin dekarboxylasou na tyramin a L-fenylalanin je fenylalaninamoniaklyasou (PAL) přeměněn na kyselinu skořicovou a amoniak. Kyselina skořicová je degradována přes kyselinu p-kumarovou a kyselinu kávovou na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká Schiffova báze, jejíž redukcí vzniká 4'-O-methylnorbelladin⁴⁸.

V alkaloidech čeledi Amaryllidaceae slouží L-fenylalanin jako primární prekurzor fragmentu C6-C1, odpovídající kruhu A a benzylové skupině na C-6 uhlíku. L-tyrosin je prekurzorem kruhu C, dvou uhlíkatého řetězce C11-C12 a dusíku na C6-C2.

Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány dle svého hlavního reprezentanta. Jmenovitě se jedná o lykorinový, homolykorinový, haemanthaminový, pankratiustinový, tazettinový a galantaminový typ. Biosyntetická cesta vedoucí k montaninovému strukturnímu typu nebyla doposud spolehlivě objasněna. K hlavním typům je také řazen belladinový typ, ze kterého vychází vlastní biosyntéza amarylkovitých alkaloidů⁴⁹.





3.2.5 Klasifikace alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou podle Ghoshalova modelu rozděleny podle strukturních odlišností do devíti základních skupin. Na základě této klasifikace má každá skupina svého zástupce, kterými jsou: lykorin, krinin, haemanthamin, pankratistatin, galanthamin, tazettin, homolykorin, montanin a norbelladin. Podle těchto základních struktur je pojmenována vždy celá skupina alkaloidů⁵⁰.

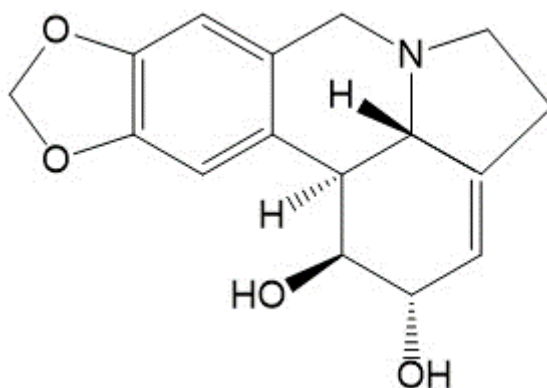
3.2.5.1 Lykorinový typ

Hlavním zástupce této skupiny je Lykorin, který byl v roce 1877 prvním izolovaným alkaloidem čeledi Amaryllidaceae získaným z *Narcissus pseudonarcissus*⁵¹. Můžeme jej nalézt v rodech *Lycoris*, *Leucojum*, *Hymenocallis*, *Ammocharis*, *Brunsvigia* a *Crinum*.

Lykorin je pyrollofenanthridinový cyklický alkaloid při jehož vzniku se uplatňuje *ortho-para* intramolekulární oxidativní spojení. Lykorin vykazuje mnohé farmakologické účinky, například antivirový, protizánětlivý, antibakteriální, antiprotozoální, antimalarický,

antimykotický a hlavně protinádorový účinek. Alkaloidy lykorinového strukturního typu patří mezi nejnámější a z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k neúčinnějším v celé čeledi. Lykorin indukuje apoptózu u nádorových buněk, čímž inhibuje jejich proliferaci, má významnou inhibiční aktivitu vůči DNA topoizomeráze, která je nutná pro růst rakovinných buněk. Lykorin vykazuje relativně slabou inhibiční aktivitu vůči AchE. Jeho velkou výhodou je poměrně nízká toxicita a výskyt nežádoucích účinků⁵². Některé deriváty alkaloidu Lykorinu by také mohly být potenciálními léky na AD. Neúčinnější z nich, 1-O-acetyllykorin, který se účinkem vyrovná galantaminu byl izolován z *Ammocharis coranica*⁵³.

Do skupiny alkaloidů lykorinového typu spadají i další látky podobné struktury, jako například, karantin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-O-acetyllykorin, lykorin-2-on, pluvin, amarbellisin a galanthin.



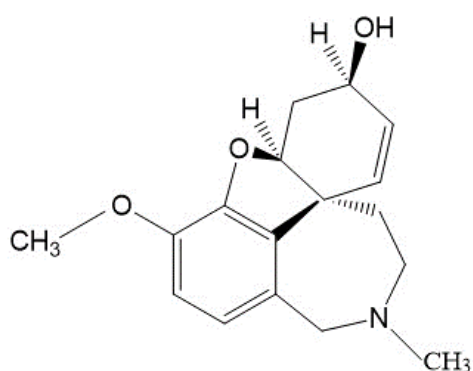
Obr. 8: vzorec Lykorinu

3.2.5.2 Galantaminový typ

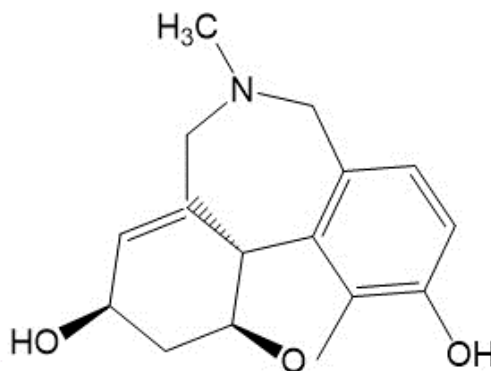
Strukturním základem této skupiny alkaloidů je dibenzofuran, dále je charakteristická přítomnost dvou hydroxy skupin na aromatickém kruhu. Alkaloidy této skupiny vznikají intramolekulárním oxidativním spojením para-ortho.

Nejvýznamnějším zástupcem z medicínského hlediska je Galantamin, poprvé izolovaný v roce 1952 z cibule sněženy *Galanthus woronowii*⁵⁴. Jeho nejvyužívanější schopností je reverzibilní, kompetitivní inhibice AchE, čehož se využívá v terapii AD. Výhodou galathaminu je to, že vykazuje až 53× větší selektivitu k AChE než k BuChE⁵⁵.

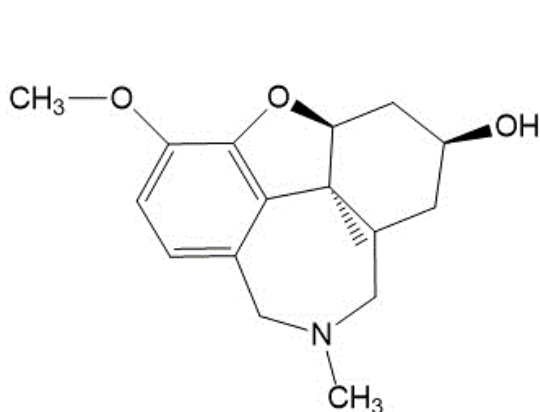
Mezi zástupce této skupiny patří epigalanthamin, *O*-acetylgalanthamin, norgalanthamin, epinorgalanthamin, sanguinin, narcisin a narwedín. Z dalších pak například lykoramin, norlykoramin a epinorlykoramin, které se liší absencí dvojné vazby na C-9. Poměrně silnou inhibiční aktivitu vůči AchE vykazuje i sanguinin. Jeho inhibiční aktivita spočívá v přítomnosti dvou hydroxyskupin, které vytvářejí vodíkovou vazbu a jejím prostřednictvím dochází k efektivnější vazbě na molekulu AchE. Dvojná vazba na C-9 pravděpodobně snižuje inhibiční aktivitu, protože znemožňuje stejnou prostorovou konformaci charakteristickou pro aktivnější alkaloidy⁵⁶.



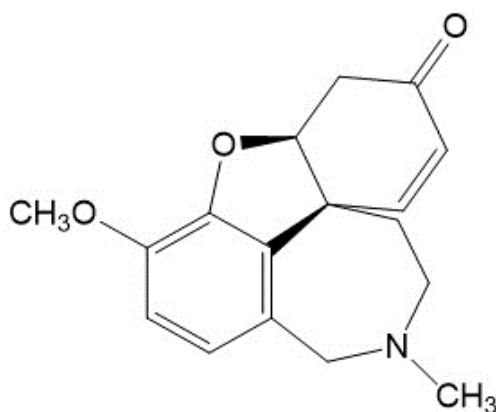
Obr. 9: vzorec Galantaminu



Obr. 10: vzorec Sanguininu



Obr. 11: vzorec Lykoraminu



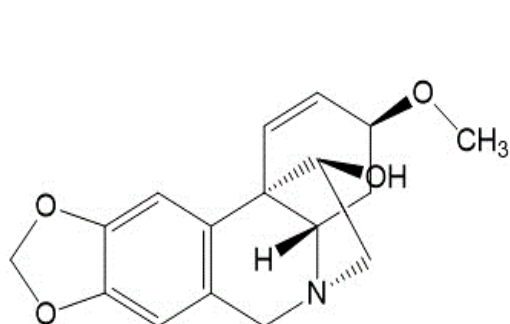
Obr. 12: vzorec Narwedínu

3.2.5.3 Krininový a haemanthaminový typ

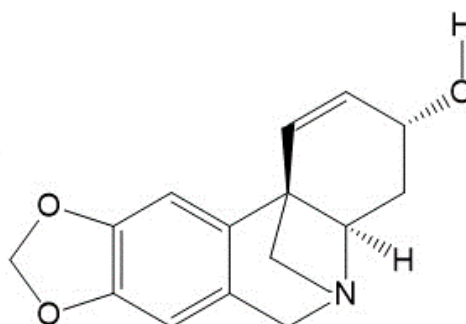
Alkaloidy tohoto typu jsou odvozeny od 5,10b-ethanofenanthridinu a vznikají intramolekulárním oxidativním spojením *para-para*. Do této skupiny řadíme kromě krininu také krinamin, haemanthamin, haemanthidin, ambellin a další. Mezi vůbec neúčinnější alkaloidy této skupiny patří haemanthamin, haemathidin a krinamin, které působí cytotoxicky na nádorové buňky⁵⁷.

Haemanthamin je po lykorinu druhým nejhojnějším alkaloidem vyskytujícím se v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*. Vyskytuje se převážně v cibulích rodu *Haemanthus* a *Narcissus*. Jeho hydroxyderivát haemathidin má antiparazitické, protizánětlivé a analgetické účinky⁵⁸.

Alkaloid Krynin se vyskytuje hlavně v rodech *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Narcissus*, *Nerine* a *Hymenocalis*. Je významný pro svou antimalarickou aktivitu vůči *Plasmodium falciparum*, která je pravděpodobně přisuzována přítomnosti methylenedioxylové skupiny vázané na aromatickém jádře⁵⁹.



Obr. 13: vzorec Heamanthaminu

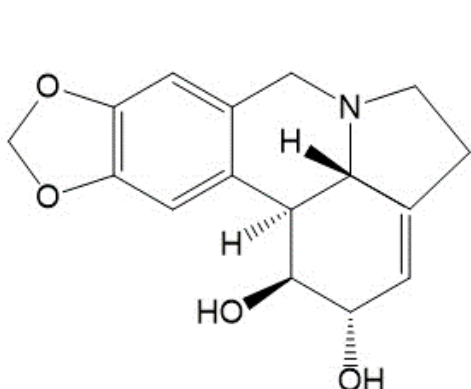


Obr. 14: vzorec Krininu

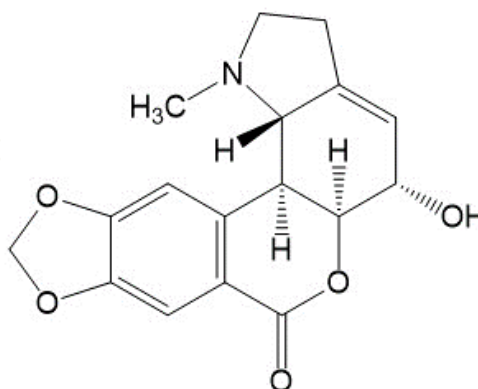
3.2.5.4 Homolykorinový typ

Tyto typ alkaloidů je odvozen od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. Při vzniku těchto struktur se uplatňuje *ortho-para* intramolekulární oxidativní spojení. Většina alkaloidů homolykorinového typu obsahuje laktonový kruh, který vzniká díky oxidaci hydroxylaminové skupiny na C-6. Homolykorinové alkaloidy vznikají přeměnou lykorinových alkaloidů. Do této skupiny patří celá řada alkaloidů, ale jen některé mají významnou biologickou aktivitu.

Hlavní zástupce lykorein a další alkaloidy homolykorein, 8-*O*-demethylhomolykorin a hippeastrin vykazují cytotoxický efekt, bohužel i k nenádorovým buňkám⁶⁰. Za zmínku stojí i antivirová aktivita hippeastrinu vůči *Herpes simplex* viru⁶¹.



Obr. 15: vzorec Lykorinu



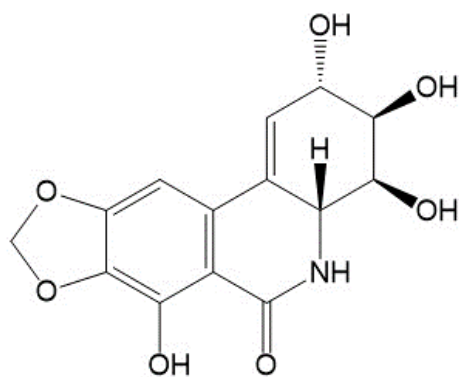
Obr. 16: vzorec Hippeastrinu

3.2.5.5 Narciklasinový typ

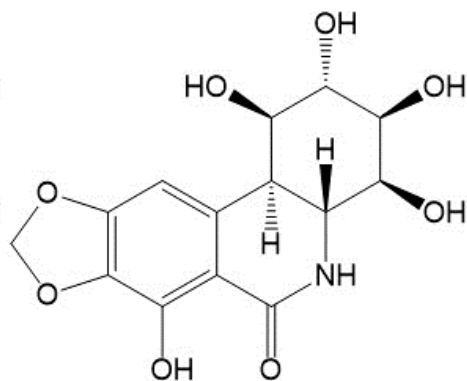
Narciklasinové alkaloidy jsou odvozeny od fenanthridinu a vznikají intramolekulárním oxidativním spojením *para-para*. Hlavní zástupci této skupiny jsou narciklasin, pancratistatin a lycoridin. Pro tento typ alkaloidů je charakteristická vysoká cytotoxická aktivita a selektivita vůči nádorovým buňkám. Nejslibnější látky z pohledu cytotoxické aktivity jsou narciklasin a pankratistatin.

Narciklasin je alkaloid, který byl poprvé izolován v roce 1967 z cibulí zástupců rodu *Narcissus*. Mechanismus jeho cytotoxického působení spočívá ve vazbě na ribozomální podjednotku 60S, kde inhibuje peptidyltransferasu, čímž brání vzniku peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu. Pravděpodobně také interaguje nebo tvoří komplexy s molekulou DNA živočišných buněk⁶².

Pancratistatin indukuje selektivní apoptózu a buněčnou autofagii doprovázenou kolapsem mitochondriálního membránového potenciálu buněk a následně zvýšenou tvorbou kyslíkatých reaktivních sloučenin⁶³.



Obr. 17: vzorec Narciklasinu



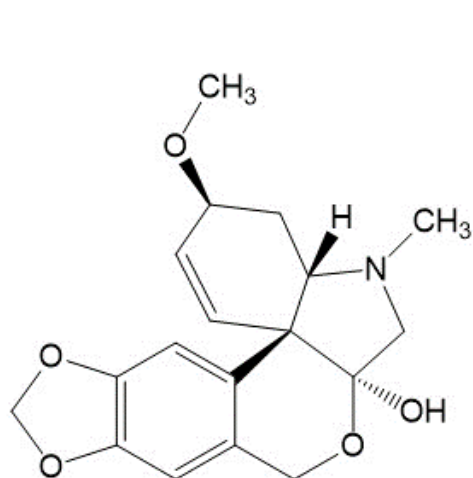
Obr. 18: vzorec Pankratistatinu

3.2.5.6 Tazettinový typ

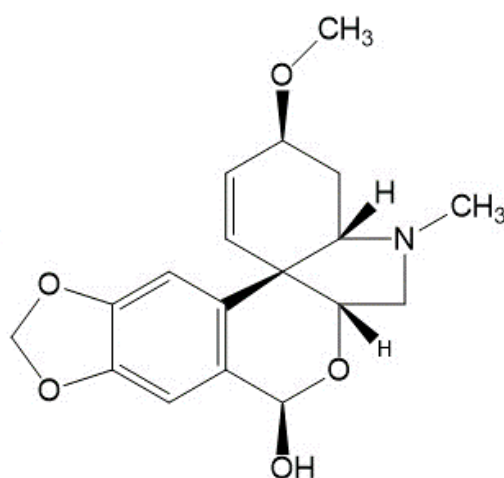
Jedná se o deriváty odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu vznikající intramolekulárním oxidativním spojením *para-para*. Hlavní zástupci této skupiny jsou tazettin, pretazettin, nortazettin, macronin a 3-epimacronin. Pretazettin vzniká biosyntézou z haemanthidinu. Přesmykem chemicky nestabilního pretazettinu vzniká tazettin.

Tazettin je jeden z nejčastěji se vyskytujících alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Poprvé byl izolován z rostliny *Narcissus tazetta* v roce 1934. Tazettin vykazuje antimalarickou aktivitu, ovšem jeho cytotoxická aktivita poměrně nízká. Naopak mnohem účinnější než tazettin je jeho prekurzor pretazettin⁶⁴.

Pretazettin inhibuje vazbou enzymu aktivitu RNA-dependentní DNA polymerasy u rozdílných typů onkogenních virů a je účinný proti *Herpes simplex* a flavivirům⁶⁵.



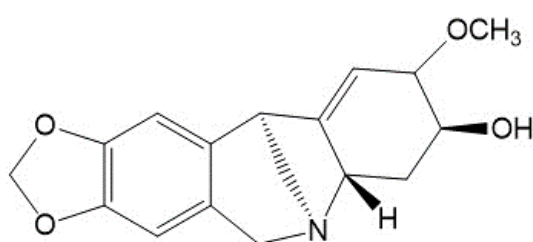
Obr. 19: vzorec Tazettinu



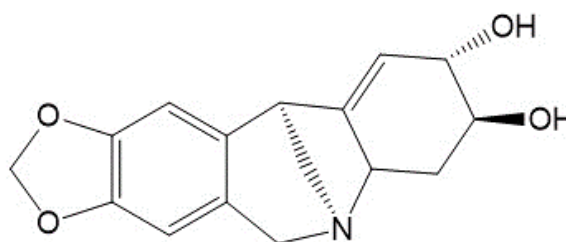
Obr. 20: vzorec Pretazettinu

3.2.5.7 Montaninový typ

Tato skupina alkaloidů má skelet odvozený od 5,11-methanomorphanthridinu a liší se pouze konfigurací na C-2 a C-3. Alkaloidy vznikají intramolekulárním oxidativním spojením *para-para*. Hlavní reprezentanti této skupiny jsou montanin, *o*-acetylmontanin, pankracin, koccinin, manthin a brunsvigin. Tento typ alkaloidů je obtížně dostupný z přírodních zdrojů, protože je obsažen pouze ve velmi malém množství v několika druzích *Pancratinum* a *Narcissus*⁶⁶. Oproti ostatním typům alkaloidů mají montaniové alkaloidy poměrně rozdílné biologické účinky. Jedná se například o efekt antidepresivní, antikonvulzivní, anxiolytický a slabý hypotenzní účinek⁶⁷.



Obr. 21: vzorec Montaninu



Obr. 22: vzorec Pankracinu

3.2.6 Rod *Narcissus*

Narcisy jsou vytrvalé pozemní byliny. Jejich rod obsahuje přibližně 50-80 druhů v závislosti na tom, jak jsou klasifikovány v důsledku hybridizace a podobnosti mezi druhy. Místem jejich výskytu je jihozápadní Evropa zejména Pyrenejský poloostrov, sever Afriky a některé oblasti na Blízkém východě. V ČR není původní žádný druh z rodu *Narcissus*.

Pro rod *Narcissus* je charakteristická velká morfologická variabilita. Jednotlivé odrůdy se mezi sebou liší velikostí, tvarem, barvou, vůní, orientací květů a množstvím alkaloidů obsažených v cibulích. Složitost taxonomie rodu *Narcissus* je zapříčiněna velmi širokou populací divoce rostoucích narcisů a snadností přirozené hybridizace mezi narcisy. Stejně tak dlouhá historie pěstování a šlechtění narcisů vedla ke vzniku stovek odrůd. Počet vyšlechtěných odrůd evidovaných Královskou zahradnickou společností v Anglii přesahuje 10 000. Narcisy jsou podle mezinárodního systému členěny do 13 hlavních skupin podle charakteristiky květu.

Zástupci z rodu *Narcissus* jsou vytrvalé pozemní suhomilné byliny o velikosti 5-80 cm v závislosti na druhu. Jsou to rostliny jednodomé s oboupohlavnými květy. Květy jsou jednotlivé na vrcholu stonku nebo ve zdánlivých okolících obsahující zpravidla 2-20 květů. Pod květem popřípadě květenstvím je toulcovitý listen, který je často membránovitý. Okvětí se skládá z 6 okvětních lístků ve 2 přeslenech (3+3), které jsou v dolní části srostlé v okvětní trubku. V ústí trubky je límcovitá nebo trubkovitá pakorunka. Tyčinek je 6. Gyneceum je složeno ze 3 plodolistů, je synkarpní, semeník je spodní. Plodem je třípouzdrá tobolka. Listy jsou uspořádány po několika v přízemní růžici, jsou jednoduché, přisedlé, s listovými pochvami. Čepele listů jsou celokrajné, většinou čárkovité, často ztlustlé a někdy až polooblé, žilnatina je souběžná. Podzemní cibule nejčastěji vejcovitého tvaru o velikosti od 0,6 do 10 cm; mají různě výrazný krk. Dužnatou suknicí obklopuje hnědá slupka, která zabraňuje vyschnutí. Kolem hlavní mateřské cibule se tvoří malé cibulky, které jsou zprvu spojeny s mateřskou cibulí⁶⁸.

Narcisy produkují řadu různých alkaloidů, které poskytují určitou ochranu rostlině, ale zároveň mohou být jedovaté, pokud dojde k jejich náhodnému požití. Po pozření cibulí se dostavuje bolest žaludku, nevolnost, nauzea, zvracení a průjem. Při silnější otravě nastává třesavka, křeče a paralýza⁶⁹. Prvním izolovaným alkaloidem z narcisů byl Lykorin v roce 1877 z *Narcissus pseudonarcissus*⁵¹. (Obr. 21) Do dnešní doby bylo izolováno a identifikováno více než 100 jednotlivých alkaloidů. Mezi nejvýznamnější zástupce patří galanthamin a lykorin. Tyto alkaloidy, jejichž obsah v cibulích se pohybuje mezi 1 až 2 % hmotnosti jsou příčinou toxických projevů při požití těchto rostlin.

Alkaloidy tohoto rodu nejsou zajímavé pouze z toxikologického hlediska, ale také z hlediska lékařského. První dokumentované lékařské využití narcisů se datuje do doby působení Hippokrata z Kóu, který již ve 4. století před Kristem použil extrakt z *Narcissus poeticus* (Obr. 22) k léčbě nádorů v oblasti dělohy⁷⁰.

Nejvýznamnějším alkaloidem z rodu *Narcissus* je alkaloid galanthamin užívaný při léčbě AD. Galanthamin je v současné době stále získáván hlavně izolací a extrakcí z přírodních zdrojů, neboť přímá syntéza je velmi náročná a nákladná. Rostliny z rodu *Narcissus* obsahují samozřejmě i další farmakologicky zajímavé alkaloidy, o jejichž biologické aktivitě bylo pojednáno výše.



Obr. 23: *Narcissus pseudonarcissus*⁷¹



Obr. 24: *Narcissus poeticus*⁷²

3.2.6.1 *Narcissus jonquilla* L.

Narcisy tohoto druhu pocházejí ze Španělska a Portugalska. Z vejčitých cibulí vyrůstají 20-30 cm vysoké květní stonky. Listy jsou tmavě zelené, úzké a mají stejnou délku. Stvol nese až 6 žlutých květů, které mají v průměru 3–5 cm. Květy kvetou od dubna do května. Charakteristickým znakem tohoto druhu je příjemná vůně. Narcisům *jonquilla* vyhovuje výsluní⁷³.

V současné době existuje 16 kultivarů tohoto narcisu. Obsah alkaloidů, hlavně Galantaminu mezi jednotlivými kultivary poměrně kolísá. Některé kultivary by se daly potencionálně využít pro izolaci Galantaminu, jiné ovšem nevykazují ani stopy tohoto alkaloidu.

Bohužel neexistuje ani přímá úměra mezi obsahem galantaminu a cholinesterázovou inhibiční aktivitou, která může být způsobená obsahem sanguininu, který má až desetinásobně vyšší inhibiční aktivitu než galantamin⁷⁴.

Mezi nejvíce zastoupené alkaloidy stanovené pomocí GC/MS patří galantamin, lykoramin, tazettin, haemanthamin a homolykorein.



Obr. 25: *Narcissus jonquilla* L. ⁷⁵

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace

Všechna rozpouštědla byla před použitím přečištěna destilací komerčních rozpouštědel. Nejdříve byl vydestilován destilační predek a poté zbytek rozpouštědla, tedy maximálně 90 % rozpouštědla. Jednotlivé frakce byly jímány podle tabelárně uvedených teplot varů.

4.1.2 Odpařování

Ethanovové a ethyl - acetátové extrakty z analytických vzorků drog byli odpařováni při teplotě maximálně 40°C na vakuové odparce Rotavapor R 114 s vodní lázní Büchi Waterbath B-480 za sníženého tlaku. Ethanolové odparky sumárních extraktů a ethyl - acetátové odparky alkaloidních bazí určené pro zjištění biologické aktivity byly rychle odpařovány v injekčních ampulkách objemu 5 ml v proudu filtrovaného vzduchu na vodní lázni při teplotě maximálně 60 °C. Po odpaření rozpouštědel byly ampulky přeneseny do exsikátoru a sušeny ve vakuu při tlaku vzduchu 10mmHg po dobu 24 hodin nad perlami silikagelu. Poté byl do ampulek napuštěn argon, následně byly zataveny a uchovávány do doby analýzy při -22 °C.

4.2 Materiál a vybavení pro přípravu extraktů

4.2.1 Rozpouštědla

- Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru (Penta)
- Ethanol 95%, denaturovaný methanolem (Lihovar Kolín)
- Ethylacetát, p. a. (Penta)
- Methanol 1 mg/ml LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

4.2.2 Chemikálie

- Síran sodný bezvodý č. (Penta)
- Uhličitan sodný 10% roztok (w/w) (Lachema)

- Kyselina sírová 2%, p. a. (Penta)

4.3 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza

4.3.1 Rostlinný materiál

Cibule rostlin *Narcissus jonquilla* L. kultivarů Fruit Cup, Dicksickel, Hillstar, Bella Estrella, Chit Chat, Bell Song, Martinette byly zakoupeny od firmy LUKON BULBS (ČR).

Tabulka 1: Hmotnosti vzorků použitých při extrakci

ČÍSLO VZORKU*	TAXON	HMOTOST**
AL - 486	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Bella Estrella	207 g
AL - 487	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Bell Song	123 g
AL - 488	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Dicksickel	130 g
AL - 489	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Fruit Cup	142 g
AL - 490	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Hillstar	140 g
AL - 491	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Chit Chat	17 g
AL - 492	<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Martinette	313 g

* číslo vzorku z katalogizace pracovní skupiny ADINACO Group

** hmotnost vzorku použitá k extrakci

4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Suché cibule byly rozemlety na částice o velikosti přibližně 1-2 mm. Takto upravená droga byla za varu, na vodní lázni pod zpětným chladičem extrahována 95% ethanolem po dobu 15 minut od začátku varu. Následně se směs nechala 15 minut vychladnout a zfiltrovala se přes filtr z vliselinu a poté přes vrstvičku křemeliny ve filtračním tubusu. Tento extrakční postup byl proveden u každého vzorku celkem třikrát. Čirý filtrát byl zahustěn asi na 1/10 svého objemu a následně bylo přidáno přibližně 10-20 ml destilované vody. Dále bylo provedeno odpařování filtrátu ve vakuové odparce (max. 50°C) do vzniku malého suspenzního zbytku, který byl smíchán s 20 ml 2% kyseliny sírové. Suspenzní zbytek byl

sonifikován v ultrazvukové lázni SONOREX při normální teplotě a stupni 10 po dobu 5 minut. Vzniklá tekutina byla zfiltrována přes tenkou vrstvu křemeliny a zředěna vodou na cca 40-50 ml a vytřepána třikrát předestilovaným a nestabilizovaným diethyletherem. Etherová vrstva byla ostře oddělena. Potřebný kyselý vodný extrakt zůstal dole a vrchní nepotřebná etherová vrstva zůstala nahoře. Oddělená vodná kyselá vrstva se alkalizovala 10% uhličitanem sodným na pH 10 a vytřepáním alkaloidních bazí předestilovaným ethylacetátem (třikrát) byl zhotoven alkaloidní extrakt. Bezvodým síranem sodným a následnou filtrací byli odstraněny stopy zbytkové vody. Z každého alkaloidního extraktu byly odebrány 2 vzorky, které po odpaření do sucha měly hmotnost cca 10 mg pro testování biologické aktivity a cca 1 mg pro analýzu GC/MS. Zbytek extraktu byl uchováván v zatavené ampulce. Vzorky byly umístěny do exsikátoru se sušícími perlami ze silikagelu.

4.3.3 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

K identifikaci alkaloidů z rostlin *Narcissus jonquilla* L. byl využit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s Triple-Axis hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C. Nástřik byl při 280°C v objemu 1 µl a split v poměru 15:1. Dělení směsi proběhlo na koloně Agilent Technologies HP-5MS, 30m x 0,250 mm při teplotním programu 15°C/min ze 100°C na 180°C, 1 min na 180 °C, 5°C/min ze 180°C na 300°C, 40 min na 300°C. Nosný plyn byl He 5.0 (Linde) při průtoku 0,8 ml/min. Ionizace proběhla při 230°C elektrony 70 eV a detekovány byly fragmenty v rozmezí 40-600 m/z.

Alkaloidy byly identifikovány pomocí porovnávání jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty v literatuře a se standardy izolovaných v naší laboratoři.

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

4.4.3 Chemikálie, pufry, materiál, přístrojové vybavení a podmínky stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

4.4.3.1 Chemikálie

- 10mM Acetylthiocholin-jodid (Sigma-Adrich)
- 10mM Butyrylthiocholin-jodid (Sigma-Adrich)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)
- 5mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- Galanthamin-hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Company, Ltd., China)

4.4.3.2 Pufry

- 5mM Fosfátový pufr (pH 7,4)
- 5mM Fosfátový pufr obsahující 150 mM chloridu sodného (pH 7,4)
- 100mM Fosfátový pufr (pH 7,4)

4.4.3.3 Materiál

- hemolyzát lidských erytrocytů – zdroj AchE
- lidská plazma – zdroj BuChE

4.4.3.4 Přístrojové vybavení

Pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity byl použit přístroj Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA).

4.4.3.5 Podmínky měření

- Teplota 37 °C
- Prostředí fosfátového pufru pH 7,4
- Vlnová délka spektrofotometru 436 nm

4.4.4 Příprava biologického materiálu

Erythrocyty byly získány z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků. Krev se naředí s citranem sodným v poměru citran sodný:krev 1:9. Bezprostředně po odběru se krev stejnoměrně rozdělí po 5 ml do 4 šroubovacích zkumavek objemu 15 ml a provede se centrifugace při rychlosti 4000 rpm za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611 při 4 °C po dobu 10 minut. Po této první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nezůstaly žádné erythrocyty. Plazma se uchovává do doby stanovení aktivity BuChE při 4 °C, ovšem nejdéle 6 hodin.

500 µl plazmy se odebere zvlášť a se uchovává dále při normální teplotě za nepřístupu světla do doby stanovení aktivity. Po stanovení absorbance u plazmy se před rozplněním do mikrozkušavek provede filtrace přes slabou vrstvu buničité vaty.

Zbytek plazmy z erythrocytárního sedimentu se opatrně odsál a odečetl se objem erythrocytů ve všech 4 zkumavkách. Tento sediment se následně zředil 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného a byl rozdělen do 8 zkumavek po 13 ml. Suspenze se promíchá a provede se centrifugace stejným způsobem, jak je uvedeno výše při oddělování plazmy. Promytí tímto způsobem (dojde k odstranění zbytků plazmy s BuChE) se provede celkem 3x. Po tomto promytí se přidá 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby do poměru erythrocyty:pufr 1:9. Následně se směs opět homogenizuje a erythrocyty se ponechají spontánně hemolyzovat po dobu 10 minut za míchání na magnetické míchačce při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se u suspenze stanovila inhibiční aktivita vůči AchE.

4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty byly použity estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AchE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism. Výsledky byly

porovnány s hodnotami IC50 galanthaminu a huperzinu A. Procenta inhibice (% I) byla počítána dle vzorce:

$$\% I = 100 - (\Delta ABL / \Delta ASA) * 100$$

ΔABL je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

ΔASA je nárůst absorbance měřeného vzorku

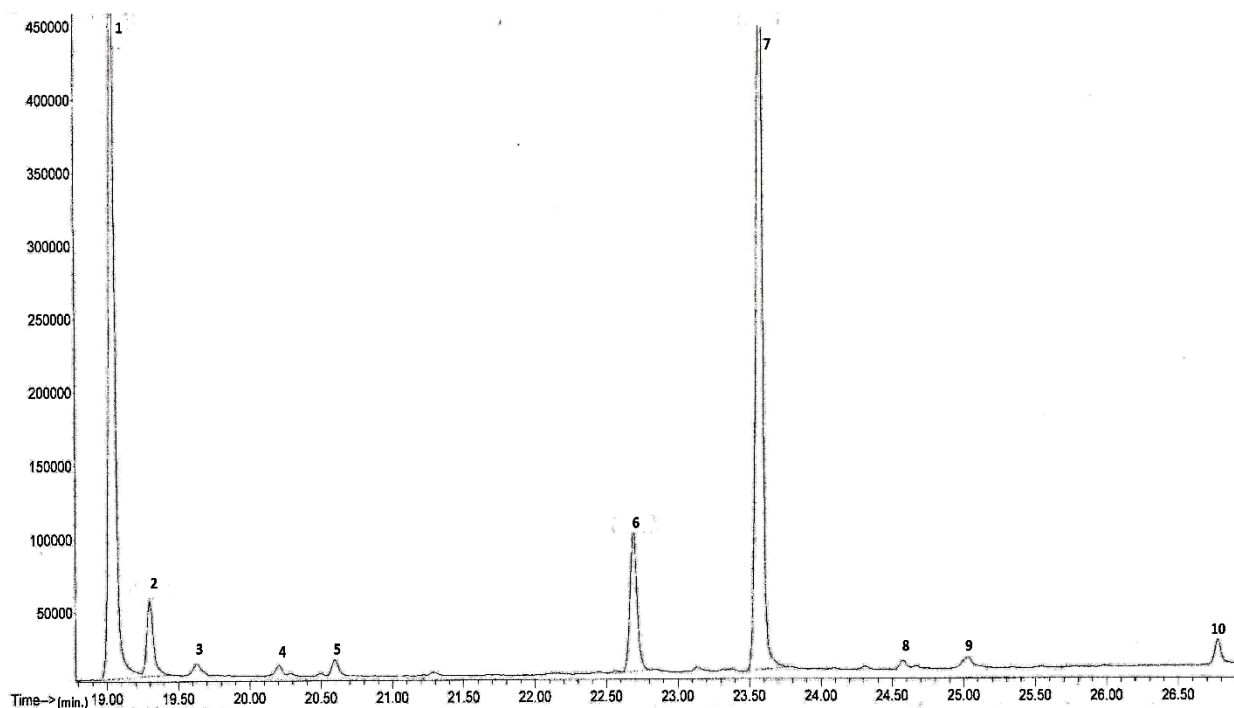
Do jamek mikrotitračních destiček se v případě slepého vzorku napipetuje 8,3 μ l plazmy nebo pouzder lidských erytrocytů, přidá se 67 μ l DTNB, 8.3 μ l rozpouštědla použitého pro ředění vzorku (DMSO), 215 μ l 100mM fosfátového pufru a 33.5 μ l roztoku substrátu.

U měřených látek (extraktů) se použijí stejné objemy činidel a roztoku substrátu. Místo samotného rozpouštědla se přidávají roztoky měřené látky o různé koncentraci (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4, v DMSO, případně nižší) či roztoky extraktů o různé koncentraci (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml, případně nižší).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Identifikace struktur v alkaloidních extraktech proběhla na základě shody retenčních časů jednotlivých složek, hmotnostních spekter a jejich porovnáním s údaji v literatuře se standardy. Hodnoty inhibiční aktivity jednotlivých alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE byly srovnávány s hodnotami inhibice galanthaminu a huperzinu A. Hodnota inhibiční aktivity galanthaminu vůči AChE IC_{50} je $1,710 \pm 0,065 \mu M$ a vůči BuChE IC_{50} $42,30 \pm 1,30 \mu M$. Hodnota inhibiční aktivity Huperzinu A vůči AChE IC_{50} je $0,033 \pm 0,001 \mu M$ a vůči BuChE IC_{50} $>1000 \mu M$.

5.1 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Bella Estrella a jeho biologická aktivita



Obr. 26: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Bella Estrella

Na základě retenčních časů jednotlivých složek, hmotnostních spekter a jejich porovnáním s údaji v literatuře se standardy se v tomto alkaloidní extraktu podařilo identifikovat 4 alkaloidy. Jedná se o galantaminový typ – Galantamin (1) a Lycoramin (2),

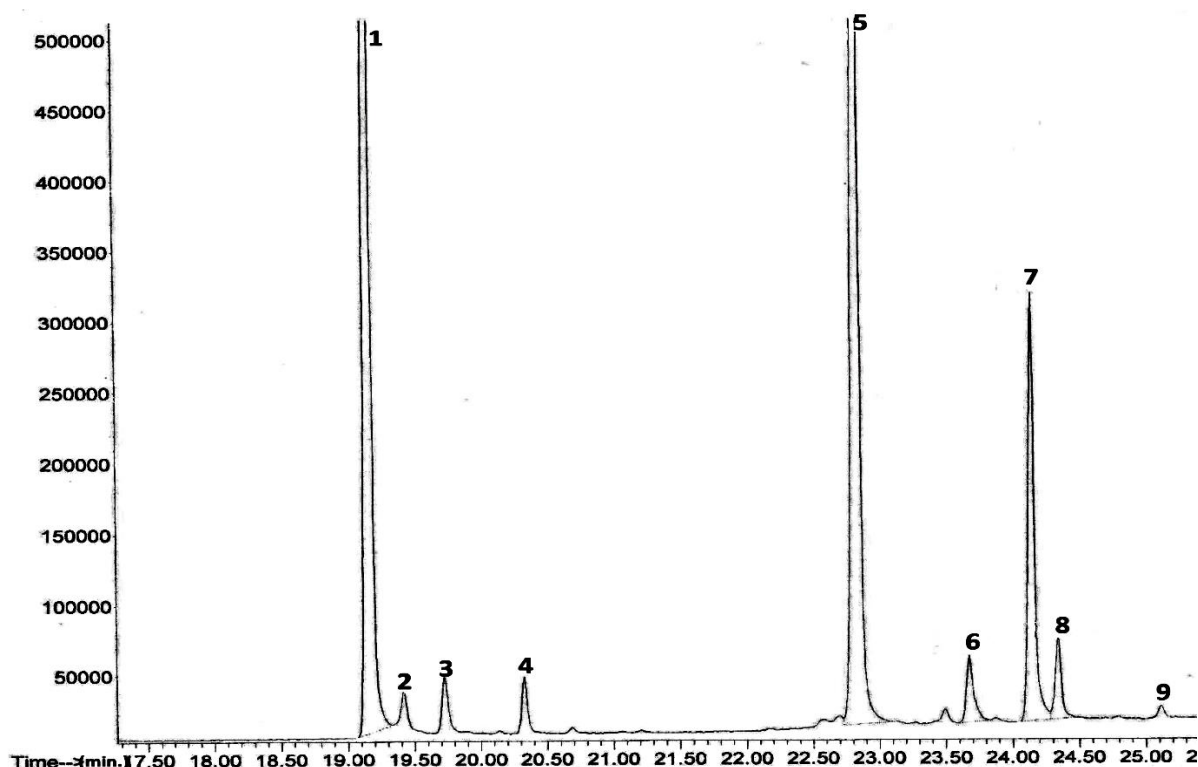
tazettinový typ – Tazettin (6) a lykorinový typ – Galanthin (7). Alkaloid (8) s nízkým procentuálním zastoupením se nepodařilo přesně identifikovat, ale pravděpodobně se jedná o lykorinový typ alkaloidu - methylpseudolycorin nebo pseudolycorin. Zbylé sloučeniny (3), (4), (5), (9) a (10) byly alkaloidního charakteru, ale nebylo možné je identifikovat.

Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} $15,43 \pm 2,52 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je třetí nejnižší hodnota ze zkoumaných extraktů a tím se stává poměrně zajímavou. Hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $18,39 \pm 1,51 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je vůbec nejnižší ze zkoumaných extraktů. Otázkou zůstává, který alkaloid je spojený s touto aktivitou, protože prozatím bylo jen velmi málo látek zkoumáno s ohledem na tuto inhibiční aktivitu.

Tabulka 2: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Bella Estrella a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Galantamin	19,05	287(80), 286(100), 270(13), 244(23), 230(11), 216(32)	39	NIST 11
Lycoramin	19,31	289(57), 288(100), 274(23), 232(79), 202(10)	5	NIST 11
A1	19,63	286(100), 270(15), 202(28)	1	-
A2	20,21	285(75), 284(100), 242(21), 228(12), 216(21), 199(24), 174(50), 128(26), 115(34)	1	-
A3	20,60	134(11), 115(20), 109(100)	1	-
Tazettin	22,70	331(27), 310(54), 298(20), 247(100), 230(13)	8	NIST 11
Galantin	23,58	317(22), 298(92), 284(11), 268(15), 243(92), 242(100)	41	NIST 11
A4	24,58	303(20), 284(91), 266(19), 242(100), 228(100), 193(79)	1	-
A5	25,03	115(20), 109(100)	1	-
A6	26,78	294(100), 252(34)	2	-

5.2 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Bell Song a jeho biologická aktivita



Obr. 27: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Bell Song

V alkaloidním extraktu z kultivaru Bell Song se podařilo identifikovat celkem 8 sloučenin. V hojném počtu se vyskytoval galantaminový typ sloučenin – Galantamin (1), který měl i největší procentuální zastoupení, Lycoramin (2) a Narwedín (4). Dalším typem byl tazettinový –Tazettin (5), také ve velkém procentuálním zastoupení a 3 – Epimacronin (9). V hojném počtu se vyskytoval i lykorinový typ sloučenin – Galantin (6), Lycorin (7) a Inkartin (8). Zbývající jedna alkaloidní struktura v nízkém procentuálním zastoupení se nepodařilo identifikovat, ale existuje pravděpodobnost, že se jedná krininový typ alkaloidů.

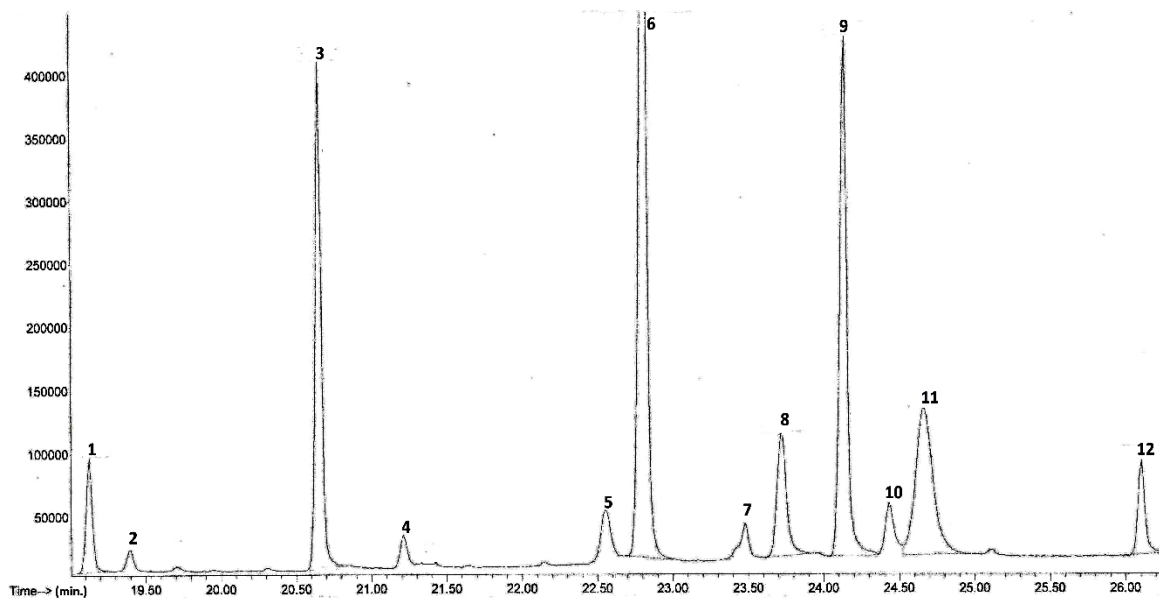
Nejzajímavější výsledek z analyzovaných extraktů ohledně inhibiční aktivity vůči AChE byl stanoven právě v tomto vzorku. Naměřená hodnota vůči AChE IC_{50} $6,19 \pm 0,85 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je nejnížší a tudíž je tento extrakt nejaktivnější ze všech vzorků. Hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $38,99 \pm 5,69 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ není poměrně zajímavá. Za slibnou inhibiční aktivitou vůči

AChE stojí zřejmě relativně velké množství galantaminu a dalších sloučenin galantaminového typu.

Tabulka3: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Bell Song a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Galantamin	19,17	287(79), 286(100), 270(12), 244(23), 230(12), 216(32)	42	NIST 11
Lycoramin	19,42	289(45), 288(100), 274(17), 232(13), 202(10)	2	NIST 11
A7	19,73	273(91), 256(69), 244(45), 229(31), 226(10), 214(80)	1	-
Narwedín	20,33	285(82), 284(100), 242(21), 228(12), 216(24), 199(22), 174(30), 128(16), 115(17)	1	NIST 11
Tazettin	22,58	331(27), 316(13), 298(20), 247(100), 230(13)	38	NIST11
Galanthin	23,70	317(16), 298(100), 284(73), 268(14), 243(90), 242(100)	2	NIST 11
Lycorin	24,15	287(26), 286(17), 268(21), 250(20), 227(64), 226(100)	11	NIST 11
Inkartin	24,35	332(100), 296(10), 258(88), 244(14), 214(62), 190(31), 162(57)	2	NIST 11
3 - Epimacronin	25,20	329(23), 314(21), 245(100), 225(14), 201(79), 139(15)	≥1	NIST 11

5.3 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Dick Sickel a jeho biologická aktivita



Obr. 28: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Dick Sickel

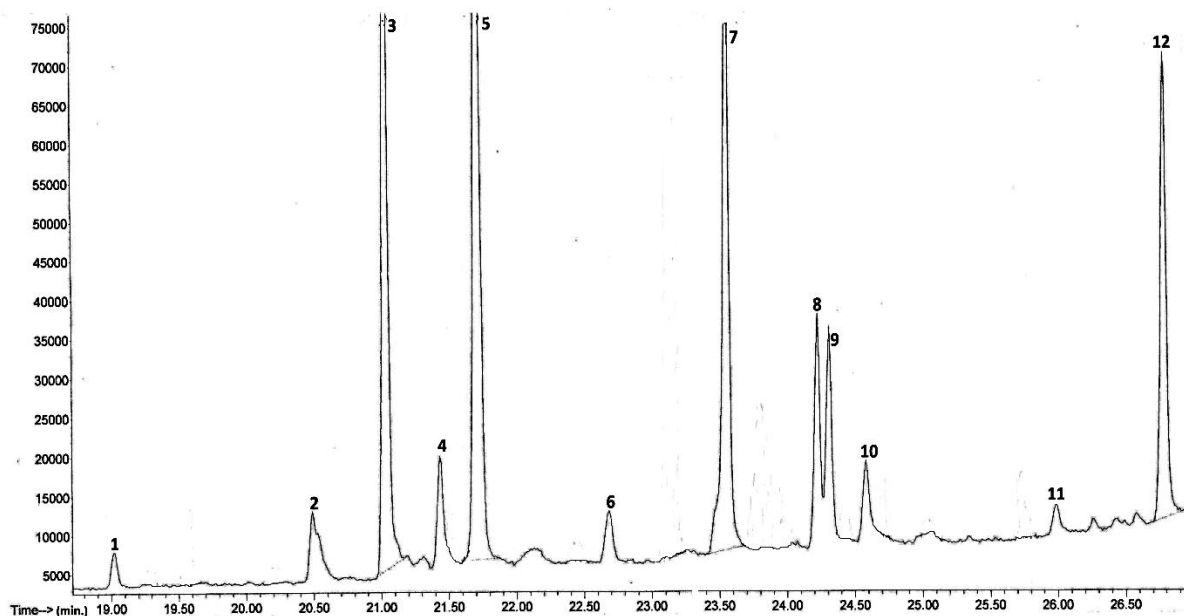
V alkaloidním extraktu z kultivaru Dick Sickel se podařilo identifikovat celkem 6 sloučenin. Vcelku malým procentuálním obsahem byl zastoupen galantaminový typ alkaloidů – Galantamin (1) a Lycoramin (2). Tazettinový typ alkaloidů byl zastoupen Tazettinem (6) s největším procentuálním zastoupením v celém alkaloidním extraktu a Nortazettinem (7). Z lykorinového typu byl přítomen Lycorin (9) a z homolykorinového typu Hippeastrin (12). Sloučeninu (3) s relativně velkým procentuálním zastoupením se bohužel nepodařilo identifikovat. Sloučenina (4) je pravděpodobně Norplavin z lykorinového typu a sloučenina (5) by mohla být pravděpodobně Heamanthamin z heamanthaminového typu alkaloidů. Sloučeniny (7), (10) a (11) se také bohužel nepodařilo identifikovat.

Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} $44,81 \pm 6,14 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ není nijak zvlášť zajímavá. Je to pravděpodobně způsobeno nízkým obsahem Galantaminu. Hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $21,07 \pm 2,84 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je druhá nejnižší ze všech testovaných alkaloidních extraktů a tím pádem i dosti zajímavá.

Tabulka 4: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Dick Sickel a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Galantamin	19,13	287(100), 286(100), 270(13), 244(22), 230(11), 216(32)	4	NIST 11
Lycoramin	19,40	289(56), 288(100), 274(27), 232(87), 202(98)	2	NIST 11
A8	20,66	314(68), 254(100), 228(27), 115(32)	15	-
A9	21,22	273(68), 273(68), 254(75), 242(13), 229(16), 228(37), 241(27)	2	-
A10	22,56	301(12), 272(100), 240(17), 225(80), 211(14)	3	-
Tazettin	22,81	331(27), 316(13), 298(20), 247(100), 230(12)	30	NIST 11
A11	23,48	287(3), 270(16), 243(35), 214(46), 199(32), 185(13)	2	-
Nortazettin	23,72	317(15), 260(70), 233(12), 201(13), 181(10)	6	NIST 11
Lycorin	24,14	287(26), 286(17), 268(21), 250(23), 227(64), 226(100)	18	NIST 11
A12	24,44	299(100), 181(42)	3	-
A13	24,67	315(1), 162(1), 134(3), 125(100), 96(30), 82(25)	12	-
Hippeastrine	26,11	315(42), 162(27), 134(20), 125(100), 96(37), 82(26)	3	NIST 11

5.4 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Fruit Cup a jeho biologická aktivita



Obr. 29: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Fruit Cup

V tomto alkaloidním extraktu bylo identifikováno celkem 6 alkaloidů. Nejméně zastoupeným alkaloidem byl Galantamin (1). Dalším identifikovaným alkaloidem byl Tazettin (6), který byl ovšem pouze v malém procentuálním zastoupení. Nejhojněji byly zastoupeny alkaloidy lykorinového typu – velké procentuální zastoupení měl Galantin (7) a dále byl identifikován Pluvin (4) a Inkartin (8). Posledním identifikovaným alkaloidem byl Homolykorin (9) z homolykorinového typu alkaloidů. Vůbec největší procentuální zastoupení měly dvě sloučeniny (3), (5), které se bohužel nepodařilo identifikovat, stejně tak se nepodařilo identifikovat sloučeninu (2). Sloučenina (3) je pravděpodobně lykorinový Acetylpluvin a sloučenina (10) by mohla být lykorinový Methylpseudolykorin. Také se bohužel nepodařilo přesně identifikovat sloučeniny (11) a (12). Ale (11) je pravděpodobně homolykorinový Hippeastrin a (12) pravděpodobně Mecambrolin.

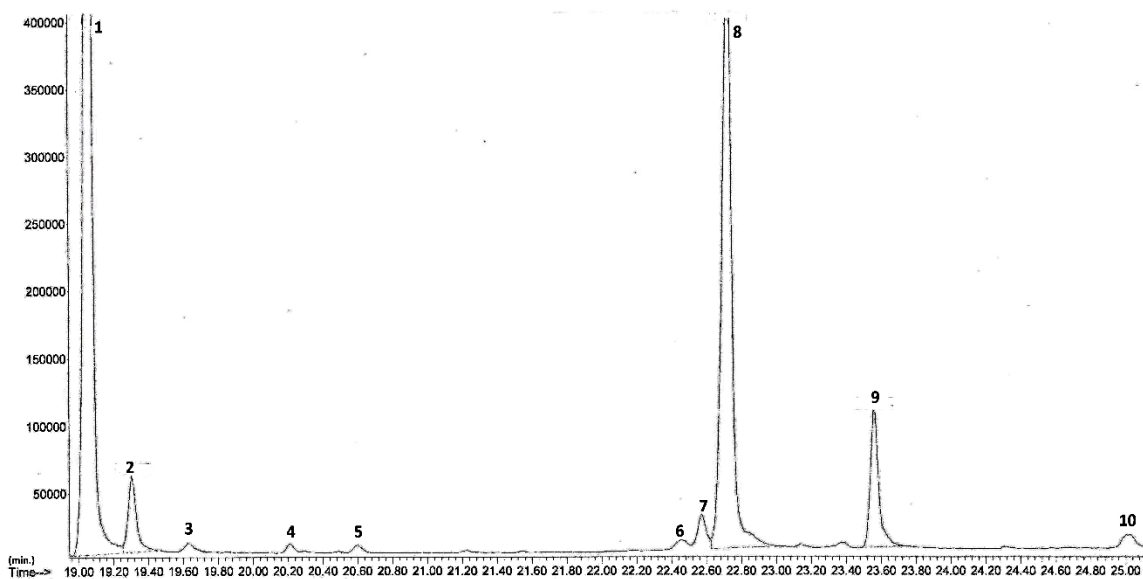
Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} $144,60 \pm 25,31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je nezajímavá. Hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $24,74 \pm 3,42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je sice zajímavější, ale stále to není nic průlomového. Alkaloidy lykorinového typu, které v tomto kultivaru převažují, jsou

slabší inhibitory cholinesteráz než alkaloidy galanthaminového typu, které zde zastupuje malé množství Galantaminu.

Tabulka 5: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Fruit Cup a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Galantamin	19,03	287(60), 286(100), 270(17), 244(24), 230(16), 216(39)	1	NIST 11
A14	20,50	109(100), 108(15), 191(89)	3	-
A15	21,04	328(70), 286(64)	20	-
Pluvin	21,44	287(68), 286(100), 268(69), 254(25), 243(15), 242(38), 228(96)	3	NIST 11
A16	21,72	266(100), 250(22), 180(74)	25	-
Tazettin	22,69	331(30), 316(15), 298(14), 247(100), 230(13)	2	NIST 11
Galanthin	23,55	317(21), 298(92), 284(11), 268(16), 243(90), 242(100)	18	NIST 11
Inkartin	24,23	333(45), 332(100), 296(12), 259(70), 258(85), 250(30)	6	NIST 11
Homolykorin	24,31	301(1), 207(4), 178(15), 110 (81), 109(100), 108(22), 94(25), 82(31)	6	NIST 11
A17	24,59	303(28), 284(19), 268(100), 242(83)	3	-
A18	25,99	315(6), 162(22), 134(37), 125(100), 96(37), 82(11)	1	-
A19	26,78	294(100), 194(54), 252(11)	12	-

5.5 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Hill Star a jeho biologická aktivita



Obr. 30: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Hill Star

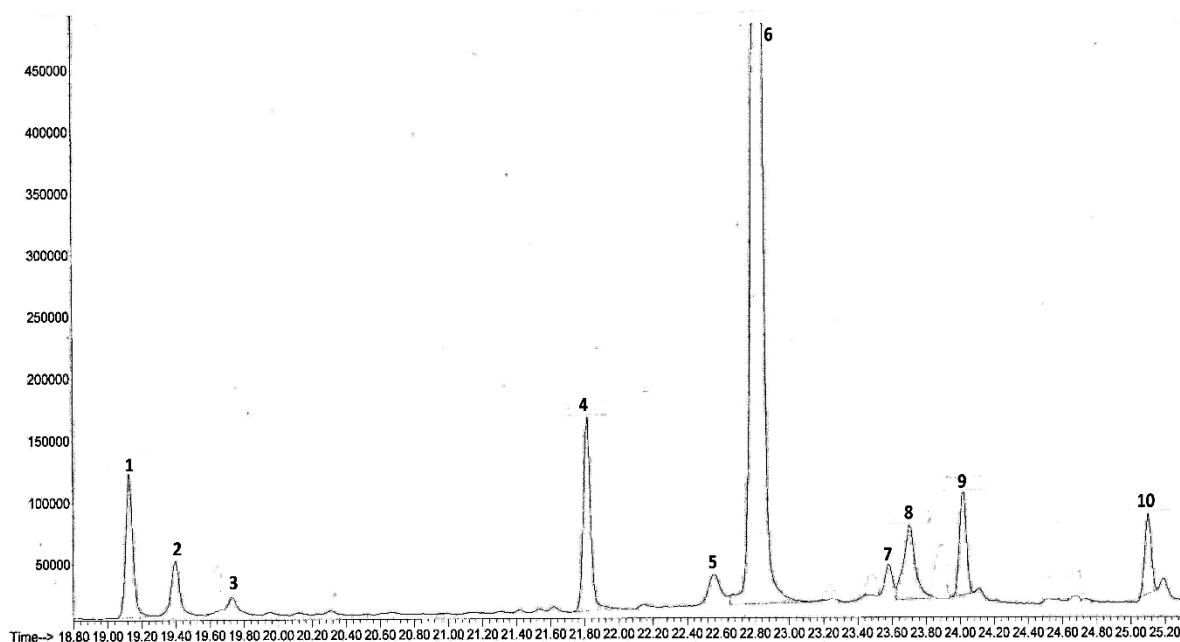
V alkaloidním extraktu z tohoto kultivaru bylo identifikováno 6 sloučenin. Hojně byly zastoupeny alkaloidy galantaminového typu – Galantamin (1) v největším procentuálním zastoupení, Lycoramin (2) a Narwedin (4). Dále byl identifikován tazettinový typ alkaloidů, hlavně Tazetin (8) ve vysokém procentuálním zastoupení a 3 – Epimacronin (10). Lykorinový typ zastupoval pouze Galanthin (9). Zbylé struktury (3), (5), (6) a (7) se nepodařilo určit. Nicméně struktura (3) by mohla být Haemanthamin a (5) Nerinin.

Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} $11,04 \pm 1,49 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je druhá nejnižší naměřená hodnota ze všech zkoumaných vzorků a tím pádem hodně zajímavá. Za slibnou inhibiční aktivitou vůči AChE stojí zřejmě relativně velké množství galantaminu a dalších sloučenin galantaminového typu. Hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $48,33 \pm 5,37 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ není příliš zajímavá.

Tabulka 6: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Hill Star a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Galantamin	19,07	287(79), 286(100), 270(13), 244(23), 230(12), 216(33)	49	NIST 11
Lycoramin	19,31	289(56), 288(100), 274(27), 232(71), 202(10)	5	NIST 11
A20	19,34	287(100), 128(24)	1	-
Narwedín	20,22	285(74), 284(100), 242(20), 228(16), 216(21), 199(22), 174(43), 128(18), 115(16)	≥1	NIST 11
A21	20,60	109(100), 94(30), 108(15)	≥1	-
A22	22,46	301(10), 272(100), 240(15), 225(14), 211(13)	1	-
A23	22,58	258(28), 225(31), 199(26)	2	-
Tazettin	22,72	331(26), 316(15), 298(20), 247(100), 230(12)	34	NIST 11
Galanthin	23,56	317(21), 298(97), 284(11), 268(16), 243(91), 242(100)	7	NIST 11
3 - Epimacronin	25,02	329(91), 314(69), 245(31), 225(55), 201(22), 139(45)	1	NIST 11

5.6 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Chit Chat a jeho biologická aktivita



Obr. 31: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Chit Chat

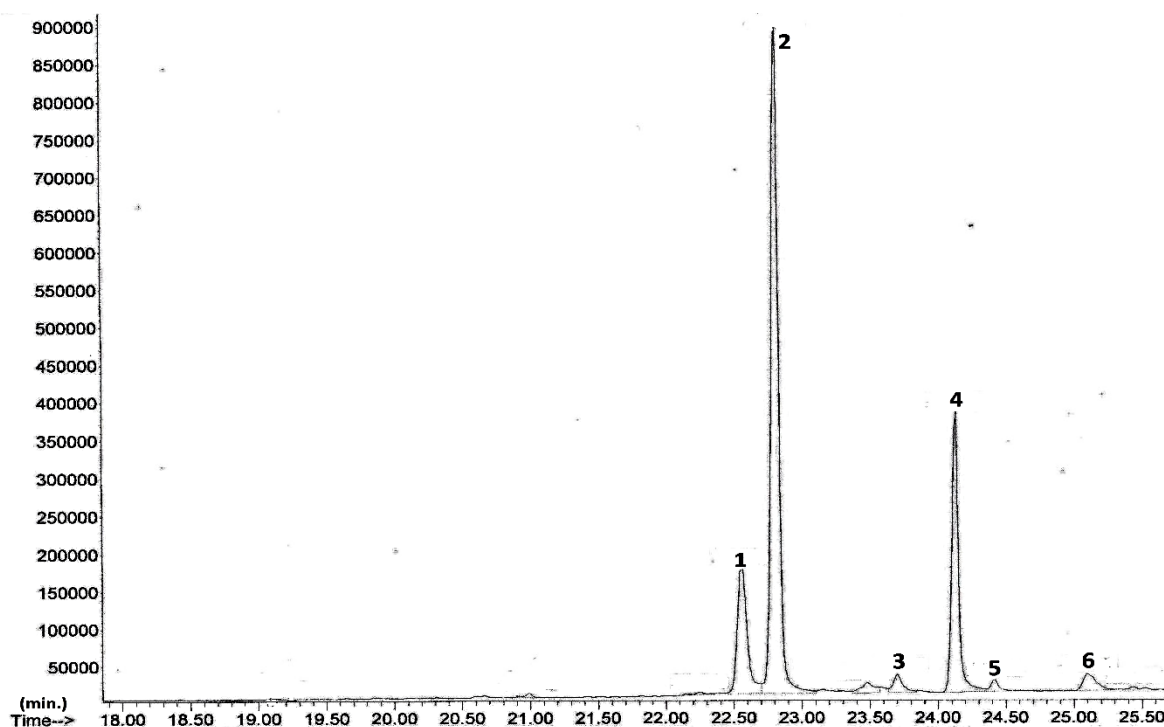
V tomto alkaloidním extraktu bylo identifikováno 6 sloučenin. V kultivaru Chit Chat dominuje tazettinový typ alkaloidů – ve vysokém procentuálním zastoupení Tazettin (6), dále Nortazettin (8) a 3 – Epimacronin (10). Galantaminový typ alkaloidů byl zastoupen Galantaminem (1) a Lycoraminem (2). Další identifikovanou strukturou byl Haemanthamin (5) z Haemanthaminového typu alkaloidů. Zbylé čtyři struktury (3), (4), (7) a (9) byly alkaloidního charakteru, ale nepodařilo se je určit.

Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} $37,83 \pm 5,01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $63,01 \pm 6,60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nejsou příliš zajímavé. Poměrně malá inhibiční aktivita je dána vysokým zastoupením Tazettinu, který má slabou inhibiční aktivitu⁷⁶. Naopak obsah Galantaminu v tomto kultivaru je malý.

Tabulka 7: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Chit Chat a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Galantamin	19,13	287(80), 286(100), 270(14), 244(24), 230(12), 216(34)	5	NIST11
Lycoramin	19,40	289(54), 288(100), 274(22), 232(76), 202(100)	3	NIST 11
A24	19,74	286(100), 287(82), 115(14)	1	-
A25	21,82	266(100), 250(21)	7	-
Haemanthamin	22,56	301(13), 272(100), 240(18), 225(41), 211(80)	3	NIST 11
Tazettin	22,82	331(28), 316(13), 298(21), 247(100), 230(12)	66	NIST 11
A26	23,56	317(100), 258(83), 204(42)	2	-
Nortazettin	23,71	317(100), 260(39), 233(59), 201(76), 181(77)	5	NIST 11
A27	24,02	268(100), 252(70)	4	-
3 – Epimacronin	25,11	329(25), 314(19), 245(100), 225(14), 201(73), 139(12)	4	NIST 11

5.7 GC/MS analýza alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Martinette a jeho biologická aktivita



Obr. 32: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Martinette

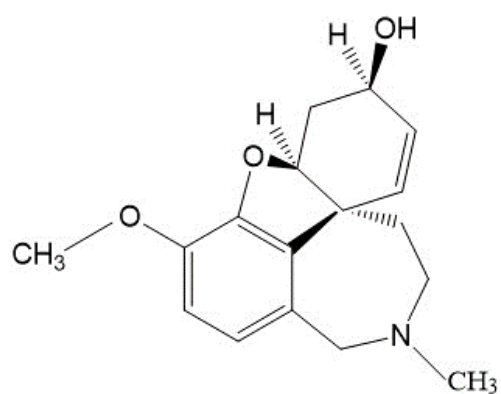
V posledním alkaloidním extraktu bylo identifikováno 5 sloučenin. Objevil se zde tazettinový typ alkaloidů – Tazettin (2) ve velkém procentuálním zastoupení a Nortazettin (3). Další identifikované struktury byly Lykorin (4), Homolykorin (5) a Haemanthamin (1). Zbývající struktura byla alkaloidního charakteru, ale bohužel se nepodařila identifikovat.

Tento alkaloidní extrakt z kultivaru Martinette vykazoval vůbec nejnižší inhibiční aktivity vůči AChE i BuChE. Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} $536,0469,77 \pm 69,77 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE IC_{50} $374,28 \pm 47,19 \mu\text{g.ml}^{-1}$ jsou naprosto nezajímavé. Tyto zanedbatelné inhibiční aktivity jsou způsobeny nepřítomností Galantaminu, vysokým zastoupením Tazettinu se slabou aktivitou⁷⁶.

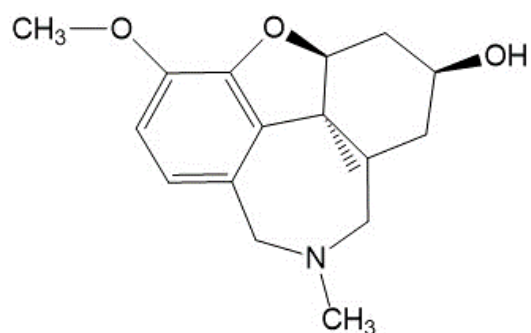
Tabulka 8: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Marttinete a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT (min.)	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
Haemanthamin	22,56	301(12), 272(100), 240(16), 225(64), 211(15)	15	NIST 11
Tazettine	22,82	331(28), 310(36), 298(20), 247(100), 230(12)	53	NIST 11
Nortazettin	23,70	317(100), 260(56), 233(89), 201(99), 181(97)	4	NIST 11
Lycorin	24,13	287(27), 286(17), 268(22), 250(24), 227(65), 226(100)	21	NIST 11
Homolycorin	24,42	301(48), 207(15), 178(15), 110(79), 109(100), 108(20), 94(32), 82(23)	3	NIST 11
A28	25,10	302(100), 245(33), 109(51)	4	-

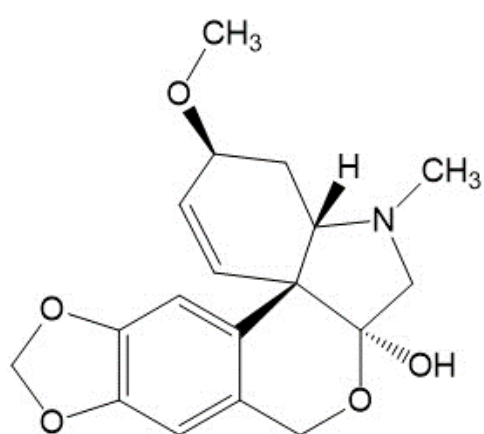
5.8 Strukturální vzorce identifikovaných alkaloidů



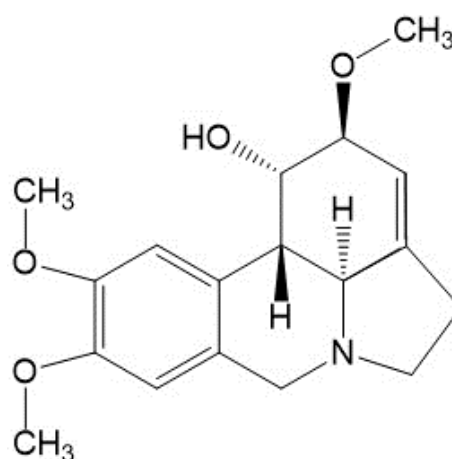
Galantamin



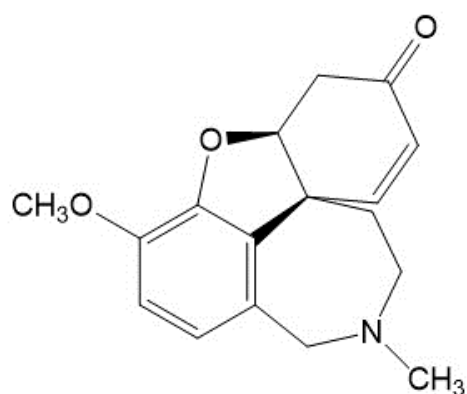
Lycoramin



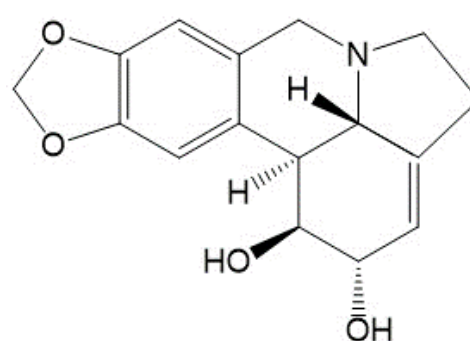
Tazettin



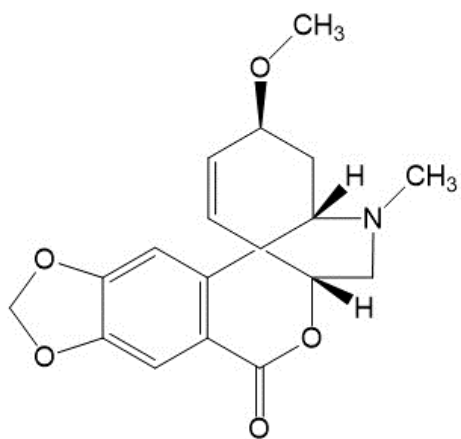
Galanthin



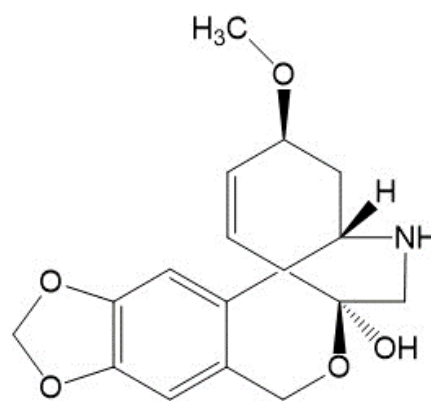
Narwedin



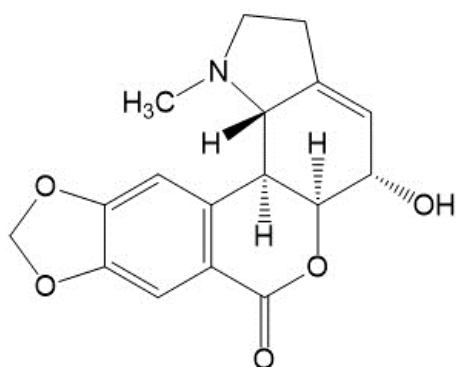
Lycorin



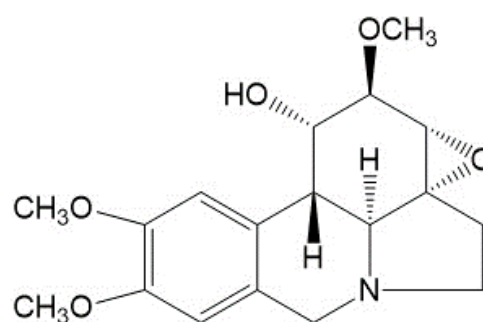
3-Epimacronin



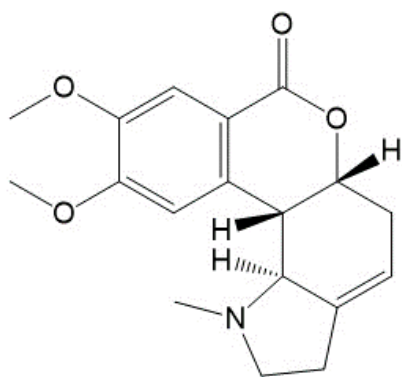
Nortazettin



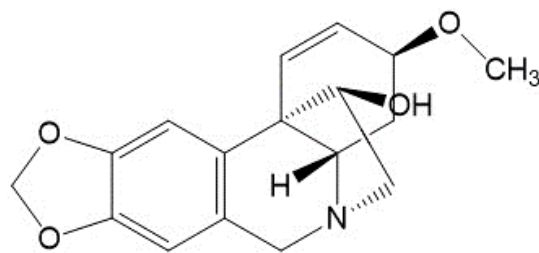
Hippeastrin



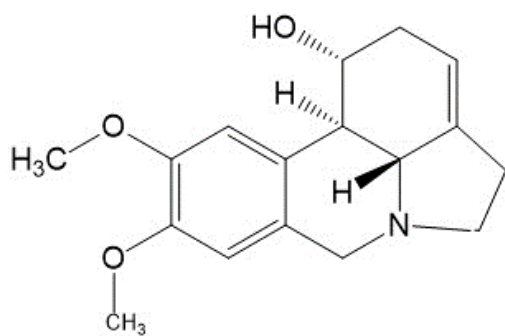
Inkartin



Homolykorin



Haemanthamin



Pluvin

Obr. 33: Strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů

5.9 Přehled biologické aktivity alkaloidních extraktů

Narcissus jonquilla

Tabulka 9: Přehled inhibice AChE a BuChE extraktů z morfologických částí vybraných taxonů (extrakty EtOAc)

Číslo vzorku	Taxon	Morfologická část	IC ₅₀ extraktů (μg.ml ⁻¹) AChE	IC ₅₀ extraktů (μg.ml ⁻¹) BuChE
AL- 486	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. BELLA ESTRELLA	cibule	15,43 ± 2,52	18,39 ± 1,51
AL- 487	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. BELL SONG	cibule	6,19 ± 0,85	38,99 ± 5,69
AL- 489	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. FRUIT CUP	cibule	144,60 ± 25,31	24,74 ± 3,42
AL- 490	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. HILLSTAR	cibule	11,04 ± 1,49	48,33 ± 5,37
AL- 491	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. CHIT CHAT	cibule	37,83 ± 5,01	63,01 ± 6,60
AL- 492	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. MARTINETTE	cibule	536,04 ± 69,77	374,28 ± 47,19
AL- 488	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. DICK SICKEL	cibule	44,81 ± 6,14	21,07 ± 2,84

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo podrobena GC/MS analýze a testování na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám (erythrocytární HuAChE, HuBuChE) 7 různých kultivarů *Narcissus jonquilla* L. z čeledi Amaryllidaceae, ze kterých byli připraveny alkaloidní extrakty.

Během jednotlivých GC/MS analýz se podařila identifikovat celá řada alkaloidů produkovaných čeledí Amaryllidaceae, které patří do různých strukturních skupin. Některé látky nebyly identifikovány a to hlavně z důvodu nedostupnosti jejich standardů a MS spekter v literatuře či v knihovných spekter. Možné je i to, že tyto látky prozatím nebyly izolovány a tudíž ani strukturně popsány. Zde je tedy nutné nejprve tyto látky izolovat v dostatečně čistém stavu a v dostatečném množství pro jejich další strukturní analýzu.

Na základě výše uvedeného dělení alkaloidů čeledi Amaryllidaceae byly v analyzovaných extraktech přítomny všechny typy alkaloidů kromě narcikasinového a montaninového typu. Dominantní zastoupení měly alkaloidy galantaminového, lykorinového a tazettinového typu.

Ze získaných výsledků aktivit jednotlivých extraktů vychází nejvyšší inhibice HuAChE pro extrakt z rostliny *Narcissus jonquilla* cv. Bell Song s hodnotou IC_{50} $6,19 \pm 0,85 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vysoká biologická aktivita je pravděpodobně způsobená vysokým obsahem alkaloidů s již prokázanou inhibiční účinností, především galanthaminu. Zajímavou inhibiční aktivitu s hodnotami IC_{50} vůči HuAChE pod $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ vykazovali i alkaloidní extrakty z kultivarů Bella Estrella a Hill Star. Mezi nejvýraznější inhibitory lidské sérové BuChE v rámci této práce patřil alkaloidní extrakt z *Narcissus jonquilla* L. cv. Bella Estrella s hodnotou IC_{50} $18,39 \pm 1,51 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Z poznatků o AD z posledních let roste význam BuChE v pokročilejších stádiích AD a proto je vhodné hledat látky s duální aktivitou vůči HuAChE a HuBuChE. Z pohledu mé práce se jeví jako nejzajímavější alkaloidní extrakt z *Narcissus jonquilla* L. cv. Bella Estrella.

Závěrem je potřeba připomenout, že hlavním cílem této diplomové práce bylo vtipovat rostlinu nejvhodnější pro fytochemickou studii na základě GC/MS analýzy a biologických testů. Z tohoto pohledu se jeví jako zajímavé právě rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Bella Estrella a *Narcissus jonquilla* cv. Bell Song. Právě u těchto dvou kultivarů nacházíme významnou inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám a zároveň i určité množství dosud nepřesně identifikovaných struktur, které by za tuto aktivitu mohly být zodpovědné.

7 SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova demence
A β	β – amyloid
Ach	acetylcholin
AchE	acetylcholinesteráza
BuchE	butyrylcholinesteráza
iAchE	inhibitory acetylcholinesterázy
iChE	Inhibitor cholinesterázy
APP	amyloidový prekurzorový protein
ApoE	Apolipoprotein E
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RNS	reaktivní dusíkové radikály
THA	Takrin
HupA	Huperzin A
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
TNF α	faktor nádorové nekrózy α
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
PAL	Fenylalaninamoniaklyasa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EtOAc	Ethylacetát
GC/MS	Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie
NIST MS	Knihovna hmotnostních referenčních spekter
RT	Retenční čas

8 LITERATURA

1. Nováček F.: *Fytochemické základy botaniky*, Fontána, druhé doplněné vydání, Olomouc 2008, str. 191.
2. Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., AbouDonia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: *Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells*. J. Nat. Prod. 2010, 73, 1223.
3. Jiráček R. *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby*. Remedia; 2009, 19: 342–345.
4. Lane RM, Potkin SG, Enz A. *Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia*. International Journal of Neuropsychopharmacology; 2006, 9: 101-124.
5. Dalecká M., Havelka R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: *Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění*. Chem. Listy, 2013, 107, 701.
6. Rössner P. *Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba*. Neurologie pro praxi; 2004, 1: 11-16.
7. Nevšímalová S., Růžička E., Tichý J. et al., *NEUROLOGIE*, Galén, Dotisk prvního vydání, Praha 5, str. 187.
8. Seidl Z., Obenberger J.: *Neurologie pro studium i praxi*. Grada, Praha 2004.
9. Nevšímalová S., Růžička E., Tichý J. et al., *NEUROLOGIE*, Galén, Dotisk prvního vydání, Praha 5, str. 188.
10. Nevšímalová S., Růžička E., Tichý J. et al., *NEUROLOGIE*, Galén, Dotisk prvního vydání, Praha 5, str. 188.
11. Nevšímalová S., Růžička E., Tichý J. et al., *NEUROLOGIE*, Galén, Dotisk prvního vydání, Praha 5, str. 188.
12. Raboch J. et al., *Psychiatrie*, první vydání, Galén, Praha 2001, str. 149 – 150.
13. Koukolík F., Jiráček R., Ballenger J. F.: *Alzheimerova nemoc a další demence*, Grada, Praha 1998, str. 62.

14. Su, B., et al.: Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 2008, 5, 525-532.
15. Koukolík F., Jiráček R., Ballenger J. F.: *Alzheimerova nemoc a další demence*, Grada, Praha 1998, str. 64 - 65
16. Jiráček R. *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby*. Remedica; 2009, 19: 342–345.
17. Raboch J., Jiráček R., Paclt I.: *Psychofarmakologie pro praxi*. Triton, Praha 2005.
18. Giacobini, E.: Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2003, 18, 1-5.
19. Raboch J., Jiráček R., Paclt I.: *Psychofarmakologie pro praxi*. Triton, Praha 2005.
20. Pidrman, V.: *Demence*. První vydání, Praha, Grada, 2007, str. 34.
21. Fišar Z., v knize: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*, kap. 10, druhé vydání Grada Publishing, Praha 2009.
22. Koukolík F., Jiráček R., Ballenger J. F.: *Alzheimerova nemoc a další demence*, Grada, Praha 1998, str. 65.
23. Koukolík F., Jiráček R., Ballenger J. F.: *Alzheimerova nemoc a další demence*, Grada, Praha 1998, str. 67.
24. Fišar Z., v knize: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*, kap. 10, druhé vydání Grada Publishing, Praha 2009.
25. Cahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2014, 42, 153.
26. Raboch J., et al. *Psychiatrie*, první vydání, Galén, Praha 2001, 622 s. Kapitola 1.4 *Duševní poruchy, Alzheimerova choroba, Etiopatogeneze*, str. 149-150.
27. O'Brien R. J., Wong P. C.: *Annu. Rev. Neurosci*, 2011, 34, 185.
28. Raboch J. et al., *Psychiatrie*, první vydání, Galén, Praha 2001, str. 149 – 150.
29. Waberžinek G., Krajíčková D., v knize: *Základy speciální neurologie*, kap. 8. Karolinum, Praha 2006.
30. Tariot P. N., Farlow M. R., Grossberg G. T., Graham S. M., McDonald S., Gergel I.: *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 2004, 291 (3), 317.

31. Koukolík F., Jirák R., Ballenger J. F.: *Alzheimerova nemoc a další demence*, Grada, Praha 1998, str. 213
32. Jedlička P., Keller O.: *Speciální neurologie*, první vydání, Galén, Praha 2005, str. 220.
33. Waberžinek G., Krajíčková D., v knize: *Základy speciální neurologie*, kap. 8, Karolinum, Praha 2006 Karolinum, Praha 2006.
34. Fišar Z., v knize: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*, kap. 10. Grada Publishing, Praha 2009.
35. Black SE, Doody R, Li H, et al. *Donepezil preserves cognition and global function in patients with severe Alzheimer disease*. *Neurology* 2007; 69: 459–469.
36. Cummings J, Winblad B. *A rivastigmine patch for the treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia*. *Expert Rev Neurother* 2007; 7: 1457–1463.
37. Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E. X., Zerlin M.: *Biol. Psychiatry*, 2001, 49, 279.
38. Jirák R, Koukolík F. *Demence. Neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Praha, Galén 2004.
39. Jirák R, Borzová C, Konrád J, et al. *Demence*. In: *Psychiatrie. Doporučené postupy psychiatrické péče II*, ed. Raboch J, Anders M, Praško J, Hellerová P. Praha, Infopharm Praha 2006: 22–37.
40. Holden, M., Kelly, C.: *Use of cholinesterase inhibitors in dementia. Advances in Psychiatric Treatment*, 2002, 8, 89-96
41. Qian, Z. M., Ke, Y.: *Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease?*. *Frontiers in aging neuroscience*, 2014, 6, 1-4
42. Vazhayil, B. K. et al.: *Natural Products and its Derived Drugs for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Alzheimer's Disease-A Review*. *British Biomedical Bulletin*, 2014, 2, 359-370
43. Jahodář L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*, Karolinum, třetí vydání, Praha 2011, str. 181. 43.

43. <http://www.finerareprints.com/botanical/edward-step/21365.jpg>
44. Sambamurty, A. V. S. S.: *Taxonomy of angiosperms*. New Delhi: I. K. International, 2005, str. 578.
45. Jin Z.: *Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids*. Nat. Prod. Rep., 2013, 30, 849.
46. Heinrich M., *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. 4. kap, první vydání, Elsevier, Oxford 2010, str. 419
47. Nagy M., Grančai D., Mučaji P., v knize: *Farmakognózia – Biogenéza přírodních látek*, kap. 8. Osveta, první vydání, Martin 2011.
48. Herbert RB. *The biosynthesis of secondary metabolites*, druhé vydání, Chapman & Hall, London 1989, str. 248.
49. Dalecká M., Havelka R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: *Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění*. Chem. Listy, 2013, 107, 701.
50. Ghoshal S., Saini K. S., Razdan S.: *Chemical constituents of the Amaryllidaceae. Crinum alkaloids: their chemistry and biology*. Phytochemistry 1985, 24, 2141.
51. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: *Recent Adv. Pharm. Sci.*, 2011, 2, 65.
52. Cao, Z., Yang, P., Zhou, Q.: Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, 2013, 56, 1382-1391
53. McNulty J, et al. *Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2010; 20: 5290–5294.
54. Krejčová G, Ševelová L., *Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy*. Vojenské zdravotnické listy 2003, 1, 37-44.
55. Greenblatt H. M., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman J. L.: *FEBS Lett.* 1999, 463, 321.
56. López, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C.: *Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts*. Life Sciences, 2002, 71, 2521-2529

57. McNulty J., Nair J. J., Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C.: *Phytochemistry* 2007, 68, 1068.
58. Herrera M. R., Machocho A. K., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: *Planta Med.* 2001, 67, 191.
59. Khan M., Ather A.: *Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends.*, první vydání, Elsevier, Oxford, 2006, str. 430.
60. Weniger B., Italiano L., Beck J. P., Bastida J., Bergoñon S., Codina C., Lobstein A., Anton R.: *Planta Med.*, 1995, 61, 77.
61. Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S.: *Res. Virol.*, 1989, 140, 115.
62. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 425, 342.
63. Griffin C., McNulty J., Pandey S.: *Int. J. Oncol.*, 2011, 38, 1549.
64. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martinez V., Codina C., Viladomat F.: *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids*. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011, 2, 65.
65. Ghosal S., Saini K. S., Razdan S.: *Phytochem.* 1985, 24, 2141.
66. Cedrón, J. C., et al.: *Bioactive montanine derivatives from halide-induced rearrangements of haemanthamine-type alkaloids. Absolute configuration by VCD*. *Organic letters*, 2009, 11, 1491-1494
67. Guan, Y., Zhang, H., Pan, C., Wang, J., Huang, R., Li, Q.: *Flexible synthesis of montanine-like alkaloids: revisiting the structure of montabuphine*. *Organic & biomolecular chemistry*, 2012, 10, 3812-3814
68. Dostál J., *Nová Květena ČSSR*, vol. 2, Academia, Praha 1989, str. 758-759.
69. Hanks, G. R.: *Narcissus and daffodil: the genus narcissus*. New York, NY, Taylor & Francis, 2002, str. 4-13;39.
70. Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., AbouDonia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: *Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups*

display activity against apoptosis-resistant cancer cells. J. Nat. Prod. 2010, 73, 1223.

71. Převzato:

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/Narcissus_pseudonarcissus_\(daffodills\)_-1.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/Narcissus_pseudonarcissus_(daffodills)_-1.jpg)

72. Převzato:

https://frustratedgardener.files.wordpress.com/2013/05/img_9744.jpg

73. van Dijk H., Kurpershoek M.: *Encyklopedie cibulnatých a hlíznatých okrasných rostlin*. Rebo, Čestlice 2002.

74. Torras-Claveria L., Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: *Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity*. Ind. Crops Prod. 2013, 43, 237.

75. Převzato:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/Narcissus_jonquilla_3.jpg

76. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X., Hong, X.: Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. RSC, 2015, 5, 16562-16574.

