

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

---

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

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

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

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

Hradec Králové, květen 2017

Petra Hanusová

## PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2017

.....

Podpis

Chtěla bych poděkovat především doc. Ing. Lucii Cahlíkové za odbornou pomoc, užitečné rady, vedení v laboratoři a poskytnuté materiály, panu doc. PharmDr. Jřímu Kunešovi, Ph.D. za změření NMR spekter alkaloidů, Mgr. Kateřině Breiterové za pomoc při vykonávání experimentální části práce a Vladimíru Hanusovi za pomoc s grafickou úpravou. Dále děkuji všem lidem, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na vzniku práce. V neposlední řadě děkuji celé Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a ochotu pomoci.

Děkuji grantu SVV 260 412 za finanční podporu.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1	Čeleď Amaryllidaceae.....	9
3.1.1	Charakteristika rostlin čeledi Amaryllidaceae .....	9
3.1.2	Charakteristika rodu <i>Narcissus</i> .....	10
3.1.3	Taxonomické zařazení a charakteristika rostliny <i>Narcissus</i> cv. PROFESSOR EINSTEIN.....	13
3.1.4	Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae .....	15
3.2	Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae .....	20
3.2.1	Inhibice cholinesteráz v souvislosti s Alzheimerovou chorobou.....	20
3.2.1.1	Demence .....	20
3.2.1.1.1	Epidemiologie.....	20
3.2.1.1.2	Rozdělení demencí.....	21
3.2.1.2	Alzheimerova choroba.....	21
3.2.1.2.1	Definice .....	21
3.2.1.2.2	Historie.....	22
3.2.1.2.3	Etiopatogeneze .....	22
3.2.1.2.4	Klinický obraz .....	23
3.2.1.2.5	Stádia Alzheimerovy choroby .....	24
3.2.1.2.6	Diagnostika.....	24
3.2.1.2.7	Terapie Alzheimerovy choroby.....	25
3.2.1.2.7.1	Inhibitory cholinesteráz.....	25
3.2.1.2.7.2	Inhibitory NMDA receptorů.....	28
3.2.1.2.7.3	Další možnosti současné terapie .....	29
3.2.1.2.7.4	Možnosti budoucí terapie .....	29
3.2.2	Závislost cholinergní aktivity na strukturním typu Amaryllidaceae alkaloidů.....	31
3.2.3	Inhibice prolyl oligopeptidázy .....	34
3.2.4	Protinádorová aktivita .....	35
3.2.5	Antimalarická a další antiprotozoální aktivita .....	39
3.2.6	Antivirová aktivita.....	39
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	41

4.1	Všeobecné postupy .....	41
4.1.1	Destilace a odpařování.....	41
4.1.2	Chromatografie .....	41
4.1.2.1	Sloupcová chromatografie .....	41
4.1.2.2	Tenkvrstvá chromatografie .....	41
4.2	Potřeby .....	41
4.2.1	Rozpouštědla.....	41
4.2.2	Chemikálie .....	42
4.2.3	Detekční činidla .....	42
4.2.4	Vyvíjecí soustavy pro TLC.....	42
4.2.5	Chromatografické adsorbenty.....	42
4.3	Izolace .....	42
4.3.1	Biologický materiál .....	42
4.3.2	Extrakce drogy a zpracování extraktu .....	42
4.3.3	Sloupcová chromatografie .....	44
4.3.4	Kontrolní tenkovrstvá chromatografie .....	46
4.3.5	Zpracování frakce 6.....	47
4.3.6	Zpracování podfrakce 6/1 .....	49
4.4	Určení struktury izolovaných látek.....	50
4.4.1	GC/MS analýza .....	50
4.4.2	NMR analýzy .....	50
4.5	Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů .....	51
5	VÝSLEDKY .....	54
5.1	Strukturní analýza izolovaných látek .....	54
5.1.1	Narwedín.....	54
5.1.2	Lykoraminon.....	55
5.2	Biologická aktivita izolovaných látek .....	57
6	DISKUZE A ZÁVĚR .....	58
7	LITERATURA .....	60
8	SEZNAM ZKRATEK .....	69

# 1 ÚVOD

Už od dávných dob jsou rostliny využívány jak pro své kladné – léčebné účinky, tak pro účinky toxické, kdy ne jedna rostlina dokázala otrávit, ale dokonce i zabít. Rostliny byly používány celé nebo jejich části. Lidé nevěděli přesně jaká látka či látky jsou v nich obsaženy, ale pomocí empirie a zkušeností byli schopni postupně účinky nalézat. Dnes díky moderním metodám, jakými jsou metody analytické či separační, jsme schopni rostlinný materiál zpracovat, izolovat požadovanou látku a určit její biologický účinek.

Významné biologické účinky můžeme popisovat u sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity jsou látky, které vznikají přímo v rostlině díky speciálnímu metabolismu. Jejich přesná úloha nebyla zcela objasněna, ale víme, že tyto látky poskytují rostlině ochranu. Dále pak plní funkci signální látky – lákají opylovače, kteří jsou důležití pro roznášení semen. Mezi sekundární metabolity patří řada biologicky významných látek jakými jsou alkaloidy, glykosidy, trísloviny a mnoho dalších<sup>1</sup>.

Mezi nejvýznamnější sekundární metabolity rostlin patří bezesporu alkaloidy. Alkaloidy jsou přírodní bazické látky vyznačující se přítomností atomu dusíku vázaného uvnitř heterocyklického kruhu. Díky bazické povaze mají schopnost tvořit soli s kyselinami. Jejich vznik je podmíněn speciální biosyntetickou cestou, jejímž základem jsou obvykle aminokyseliny. Na základě struktury rozdělujeme alkaloidy na protoalkaloidy, vlastní alkaloidy a pseudoalkaloidy. Protoalkaloidy jsou látky, jejichž dusíkový atom není součástí heterocyklu (např. efedrin, kolchicin), vlastní alkaloidy jsou struktury s dusíkem vázaným v heterocyklu a pseudoalkaloidy, které nevznikají z aminokyselin, ale ve své struktuře mají zabudovaný dusík (steroidní a terpenické alkaloidy).

Alkaloidy se vyskytují především ve vyšších rostlinách. V nižších rostlinách jsou méně časté a v živočišné říši vzácné. Alkaloidy jednodušší struktury nalezneme ve více čeledích jako je tomu u nikotinu, který je obsažen v čeledích Equisetaceae, Lycopodiaceae, Crassulaceae, Solanaceae a mnoha dalších. Látky se složitější strukturou mají výskyt užší. Jmenujme například strychnin, který nalezneme pouze v rodu *Strychnos*. U rostlin obecně nacházíme hlavní alkaloid a další deriváty stejného strukturního typu. Obsah a typ alkaloidu je závislý na prostředí, ročním období, stáří rostliny, výživě a dalších faktorech<sup>2</sup>.

Významnou skupinou obsahující alkaloidy je čeleď Amaryllidaceae (Amaryllkovité), která obsahuje specifické Amaryllidaceae alkaloidy. Čeleď zahrnuje 75 rodů a asi 1100 druhů<sup>3</sup>. U těchto alkaloidů jsou popisovány významné biologické účinky, mezi které

řadíme účinky protinádorové, protivirové, antibakteriální, antimykotické, antimalarické, analgetické, a nakonec sem patří schopnost inhibovat enzym acetylcholinesterázu (AChE)<sup>3,4</sup>.

Nositelem posledního jmenovaného účinku je jeden z nejvýznamnějších alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, galantamin. Galantamin je reverzibilní, kompetitivní inhibitor AChE s dlouhým působením, který je prakticky využíván v terapii Alzheimerovy choroby<sup>4</sup>.

AD je závažné neurodegenerativní onemocnění, které se klinicky manifestuje syndromem demence. Jedná se o nejčastější příčinu demence vůbec. Tato nemoc končí letálně a patří mezi jednu z nejčtenějších primárních příčin smrti. V ČR trpí Alzheimerovou chorobou přibližně 70 000 lidí<sup>5</sup>. Počet pacientů s AD stále narůstá, a proto je potřeba dále pátrat a hledat nové látky, které by v budoucnu byly využitelné v terapii AD.

V rámci mé diplomové práce byl zpracováván rostlinný materiál *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. Snahou práce byla izolace látek v čistém stavu, za účelem následného stanovení biologických aktivit.

## 2 CÍL PRÁCE

1. Vypracování odborné rešerše k problematice Amaryllidaceae alkaloidů.
2. Příprava sumárního alkaloidního extraktu z rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. Provedení sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu. Zpracování zadané frakce za účelem izolace alespoň dvou alkaloidů v čistém stavu.
3. Strukturní identifikace izolovaných látek (NMR, MS analýzy a další).
4. Příprava izolovaných látek pro stanovení biologických aktivit.
5. Zpracování všech získaných výsledků, jejich analýza a vyhodnocení.
6. Sepsání a odevzdání diplomové práce.

# 3 TEORETICKÁ ČÁST

## 3.1 Čeleď Amaryllidaceae

### 3.1.1 Charakteristika rostlin čeledi Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae patří k početným rostlinným čeledím. Obsahuje více než 75 rodů a asi 1100 botanických druhů rostlin<sup>3</sup>. Mezi rozsáhlé rody patří *Leucojum* (bledule), *Galanthus* (sněženka), *Narcissus* (narcis), *Crinum* (křín), *Amaryllis* (amarylka), *Clivia* (klívie), *Nerine* (nerinka) a další rody<sup>1</sup>.

Rostliny mají svůj původ v Africe, ze které se čeleď postupně rozšířila do dalších míst světa. Výskyt rostlin je vázán převážně na tropickou a subtropickou oblast, ale i u nás v mírném pásmu najdeme zástupce této rostlinné čeledi. V ČR je jejich zastoupení prezentováno rody *Narcissus* (narcis), *Galanthus* (sněženka) a *Leucojum* (bledule)<sup>2</sup> (Obr.1).

Jedná se o kvetoucí vytrvalé byliny mající oddenky, hlízy nebo nejčastěji cibule. Většina z nich se vyznačuje nápadnými květy s výrazným zabarvením a vůní, díky těmto vlastnostem jsou pěstovány jako okrasné<sup>3</sup>.

Už v dávných dobách se v lidovém léčitelství využívaly účinky těchto rostlin na různé nemoci. Nejstarší zaznamenané použití sahá až do 4. století př. n. l., kdy Hippokrates z Kósu použil olej získaný z narcisu (*Narcissus poeticus*) na léčbu rakoviny dělohy<sup>4</sup>.

Čeleď Amaryllidaceae obsahuje významnou skupinu sekundárních metabolitů tzv. alkaloidy Amaryllidaceae<sup>1</sup>. Strukturně se jedná o isochinolinové alkaloidy. Jako první byl v roce 1877 izolován lykorin. V návaznosti na izolaci lykorinu bylo izolováno a popsáno více než 500 látek patřících do různých strukturních typů mající rozličné biologické účinky. Mezi zmiňované účinky patří protinádorové, protivirové, antibakteriální, antimykotické, antimalarické, analgetické a nakonec sem patří schopnost inhibovat enzym acetylcholinesterázu (AChE). Ze zmíněných účinků je největší pozornost věnována inhibici AChE, která je prakticky využívána v terapii Alzheimerovy choroby a protinádorovému působení. Konkrétní biologický účinek bývá vázaný na určitý strukturní typ alkaloidů. Schopnost inhibovat AChE je spjata především s galantaminovým strukturním typem a jeho nejvýznamnějším alkaloidem galantaminem. Naopak protinádorová aktivita je popisována u lykorinu (lykorinový typ) a naciklacinu (krininový typ)<sup>3,4</sup>.



**Obrázek 1:** Sněženka bílá (*Galanthus nivalis*)<sup>6</sup>, bledule jarní (*Leucojum vernum*)<sup>7</sup>, narcis žlutý (*Narcissus pseudonarcissus*)<sup>8</sup>

### 3.1.2 Charakteristika rodu *Narcissus*

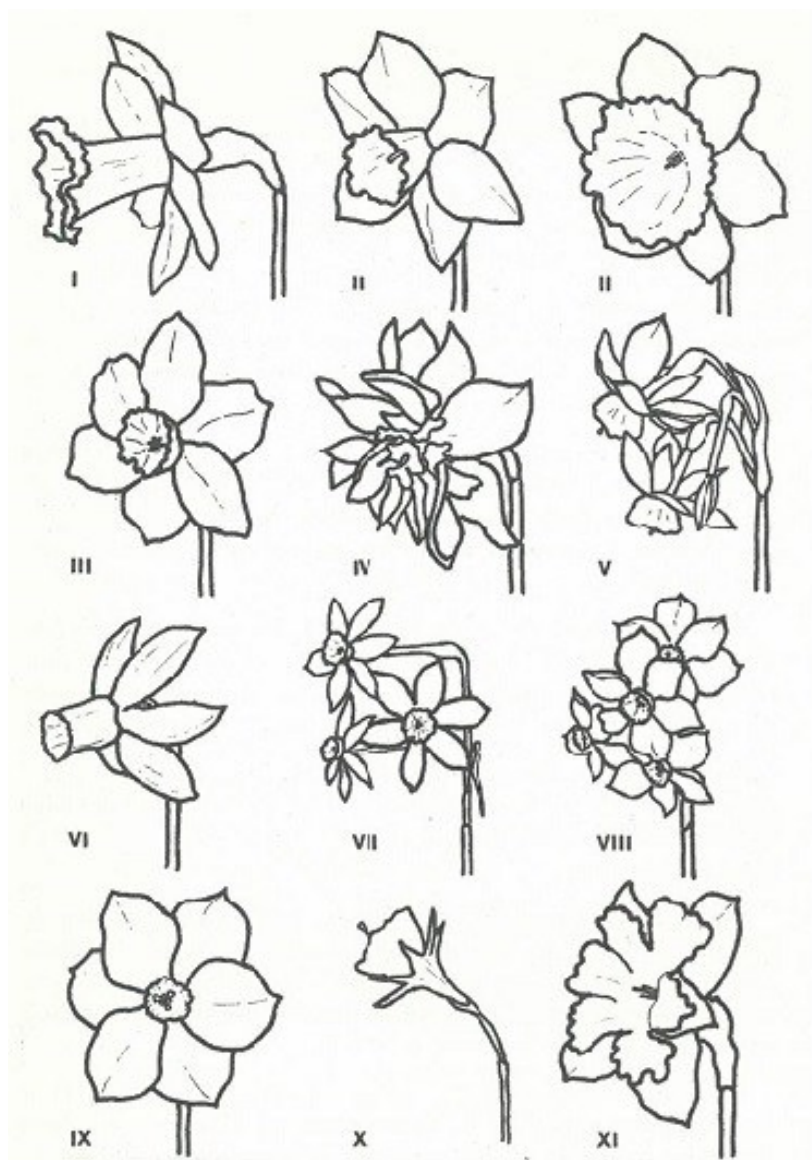
Nejobsáhlejším rodem z čeledi Amaryllidaceae je rod *Narcissus*. Rod *Narcissus* zahrnuje asi 50 botanických druhů a celou řadu botanických kultivarů<sup>9</sup>. Většina druhů *Narcissus* podléhá hybridizaci, která se stala velmi populární za účelem získat různě vypadající okrasné rostliny, přičemž je dnes registrováno více než 27000 kultivarů v The American Daffodil Society<sup>10</sup>.

Slovo *Narcissus* má původ v řečtině, ze které bylo odvozeno od slova „narke“, jehož význam překládáme jako necitelný, otupělý. *Narcissus* byl pojmenován podle řeckého mladíka, který byl krásný, ale velice namyšlený. Svou krásou se stal posedlý natolik, že nepřestával sledovat svůj obraz v jezeře, u kterého taky zemřel. Bohové prý uložili jeho ostatky do krásných květin.

Rostliny tohoto rodu kvetou většinou na jaře, ale najdou se zde i druhy kvetoucí na podzim. Jsou to především vytrvalé byliny s cibulí, listy jsou přisedlé, čárkované se souběžnou žilnatinou. Květy jsou oboupohlavné, vyskytují se na stonku jednotlivě nebo je na stonku květů více a vytvářejí zdánlivý okolík. Okvětí je tvořeno šesti okvětními lístky, které v dolní části srůstají v trubku, uprostřed se nachází koruna, jejíž květy jsou obvykle bílé nebo žluté. U kultivarů nalezneme další pestré barvy.

Rod *Narcissus* obsahuje jedovaté alkaloidy nacházející se nejčastěji v cibulích, ale i v dalších částech rostliny. V Anglii byl zaznamenán případ, kdy došlo k náhodné otravě několika žáků. Došlo k tomu při hodině vaření na základě záměny za kuchyňskou cibuli<sup>11</sup>.

The American Daffodil Society (ADS) rozděluje rostliny rodu *Narcissus* do 13 skupin (divizí) částečně podle charakteristiky květu a také z genetického hlediska<sup>9</sup>. Následující obrázek (Obr. 2) znázorňuje typy květů narcisů<sup>12</sup>, jednotlivé divize jsou charakteristikovány v následující tabulce (Tab. 1).



**Obrázek 2:** Typy květů narcisů<sup>12</sup>

**Tabulka 1:** Rozdělení rostlin rodu *Narcissus* podle ADS do divizí a jejich charakteristika<sup>13,14</sup>

<b>Číslo divize</b>	<b>Název divize</b>	<b>Popis</b>	
1	Trubkovité narcisy	Jeden květ na stonku, pakorunka stejně dlouhá nebo delší než okvětní lístky.	
2	Narcisy s velkou pakorunkou	Jeden květ na stonku, pakorunka tvoří více než třetinu délky okvětních lístků, ale méně než jejich polovinu.	
3	Narcisy s malou pakorunkou	Jeden květ na stonku, pakorunka není větší než jedna třetina délky okvětních lístků.	
4	Plnokvěté narcisy	Jeden nebo více květů na stonku, mají zdvojené okvětní nebo korunní lístky nebo oboje.	
5	Triandrus narcisy	Obvykle dva nebo více květů na stonku, okvětní lístky jsou ohnuté dozadu.	
6	Cyclamineus narcisy	Jeden květ na stonku, okvětní lístky jsou výrazně ohnuté dozadu, květ svírá pravý úhel se stonkem, stopka (pedicel) je velmi krátká.	
7	Jonquilla narcisy	Jeden až pět (vzácněji osm) květů na stonku, okvětní lístky rozvinuté nebo ohnuté, korunní ve tvaru misky, trychtýře nebo zvonku, obvykle širší než delší, květy obvykle voní.	
8	Tazetta narcisy	Obvykle tři až dvacet květů na silném stonku, okvětní lístky rozvinuté neohnuté, květy obvykle voní.	
9	Poeticus narcisy	Okvětní lístky jsou čistě bílé, korunní velmi krátké nebo diskovitého tvaru, netvoří více než jednu pětinu délky okvětních lístků, pakorunka obvykle se zeleným a/nebo žlutým středem a červeným okrajem, někdy zcela nebo částečně v jiných barvách.	
10	Bulbocodium narcisy	Obvykle jeden květ na stonku, dominantní pakorunka převládá nad zanedbatelnými okvětními lístky.	
11	Narcisy s členěnou pakorunkou	11a Collar	Dělená pakorunka, hluboce členěná a přiléhavá nebo střídavě prokládaná okvětními lístky, vytváří zdánlivě dvojité okvěti (koláry).
		11b Papillon	Plochá, obvykle šestihránná nebo členěná pakorunka, část s kontrastním středem, výrazná žebra tvoří vzhled papilonů (motýlků).
12	Ostatní kultivary narcisů	Obsahuje narcisy, které nespádají do žádné z předchozích kategorií, mnohé z nich jsou inter-divizní hybridy.	
13	Botanické druhy narcisů	Zahrnuje druhy, divoké variace a divoké hybridy, které nevznikly prostřednictvím lidské činnosti.	

### 3.1.3 Taxonomické zařazení a charakteristika rostliny *Narcissus* cv.

#### PROFESSOR EINSTEIN

Říše: rostliny (Plantae)

Podříše: cévnaté rostliny (Tracheophyta)

Oddělení: krytosemenné (Magnoliophyta)

Třída: jednoděložné (Liliopsida)

Řád: chřestotvaré (Asparagales)

Čeleď: amarylkovité (Amaryllidaceae)

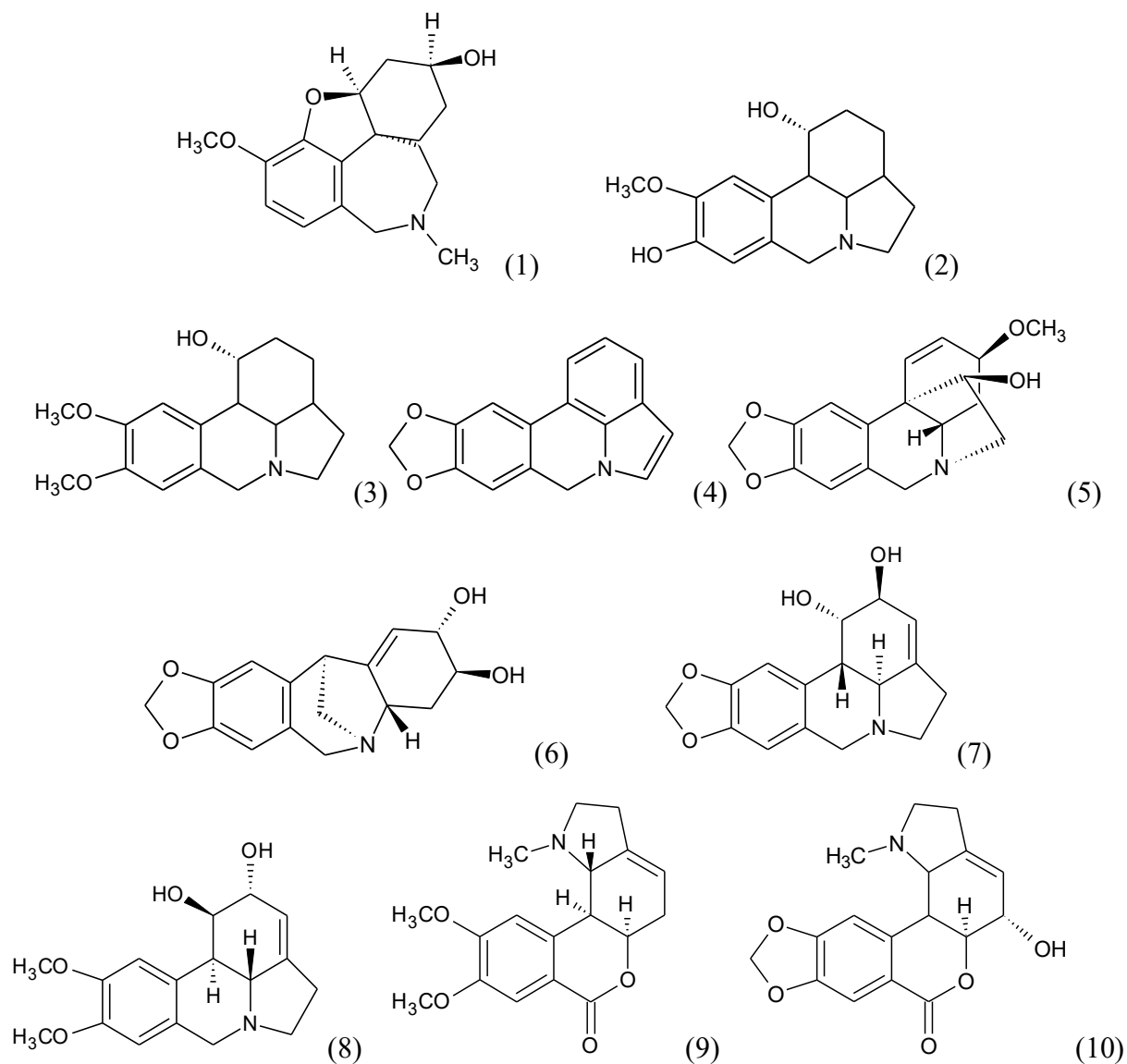
Rod: narcis (*Narcissus*)

V rámci této diplomové práce byl získán a zpracováván kultivar *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN (Obr. 3). Tento kultivar byl vyšlechtěn pro okrasné účely. Díky své vůni a krásným květům patří k oblíbeným rostlinám. Podle ADS patří do 2. skupiny – narcisy s velkou pakorunkou. Pakorunka tvoří více než třetinu délky okvětních lístků, ale méně než jejich polovinu. Okvětní lístky jsou bílé a korunní oranžovo-červené. Každý stonek nese pouze jeden vonící květ<sup>9</sup>.



**Obrázek 3:** *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN<sup>15</sup>

Kromě své okrasné funkce, poutá tento kultivar pozornost i z hlediska výzkumu. V rámci předchozí práce<sup>16</sup> byl alkaloidní extrakt podroben GC-MS analýze, díky které byla prokázána přítomnost řady alkaloidů (Obr. 4). Identifikované alkaloidy náleží do následujících strukturních typů – galantaminový (lykoramin), lykorinový (norpluviin, pluviin, 11, 12-didehydroanhydrolykorin, lykorin, 9-*O*-methylpseudolykorin), haemanthaminový (haemanthamin), montaninový (pankracin) a homolykorinový (homolykorin, hippeastrin).



**Obrázek 4:** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN - lykoramin (1), norpluviin (2), pluviin (3), 11, 12-didehydroanhydrolykorin (4), haemanthamin (5), pankracin (6), lykorin (7), 9-O-methylpseudolykorin (8), homolykorin (9), hippeastrin (10)

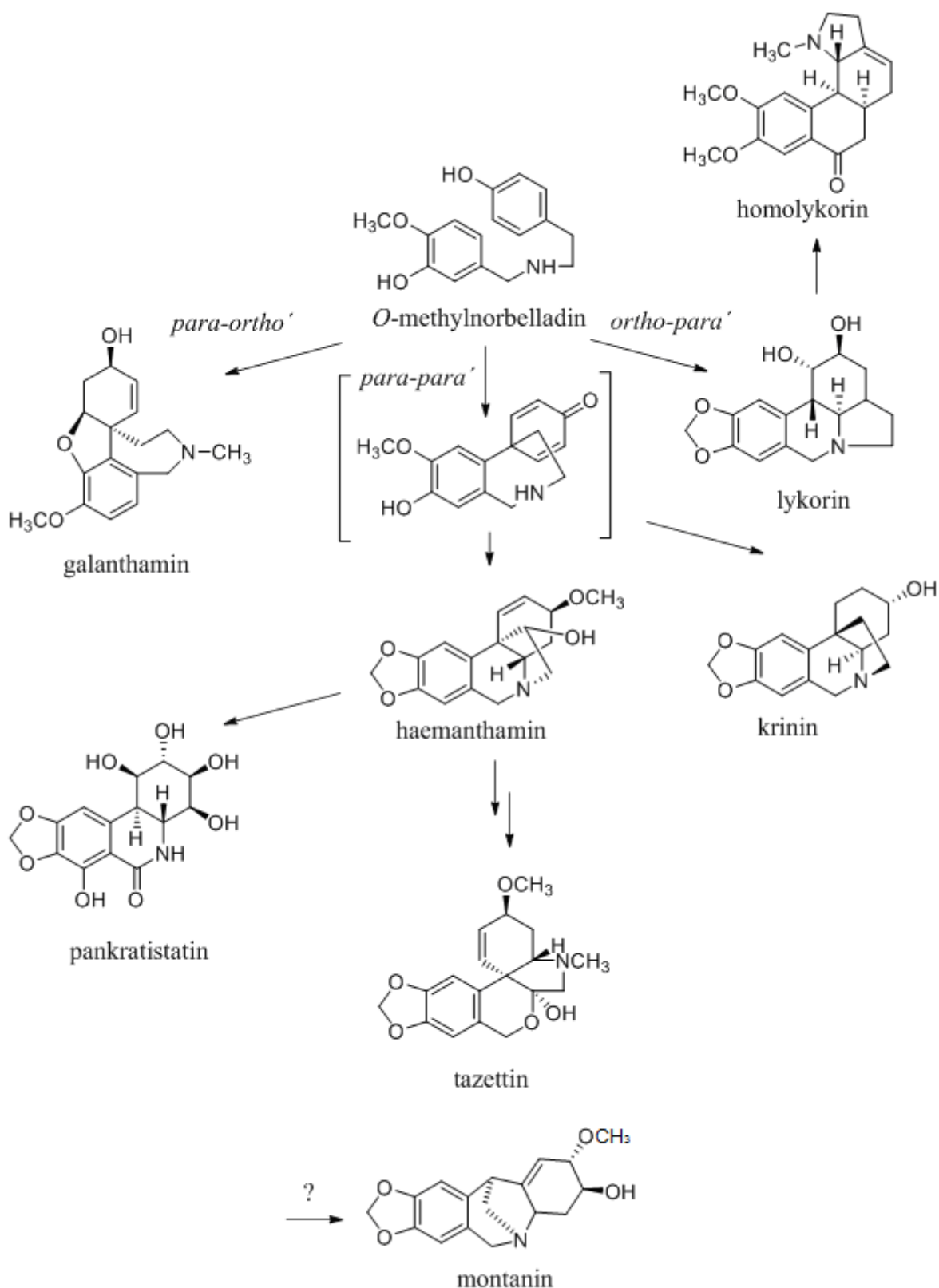
### 3.1.4 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Amaryllidaceae alkaloidy jsou velmi početnou skupinou sekundárních metabolitů. Vznikají z jediného prekurzoru, z něhož se enzymatickými reakcemi vytváří značné množství různých alkaloidů. Alkaloidy se liší u jednotlivých druhů i kultivarů. Jejich obsah se různí i v rámci jedné rostliny, ve které se většinou nachází jeden (někdy více) hlavní alkaloid zastoupený ve větším množství a alkaloidy vedlejší, kterých bývá obsahově méně<sup>17</sup>.

Amaryllidaceae alkaloidy vznikají speciální cestou, která se označuje jako tzv. norbelladinová cesta (Obr. 5). Název získala podle prekurzoru Amaryllidaceae alkaloidů norbelladinu.

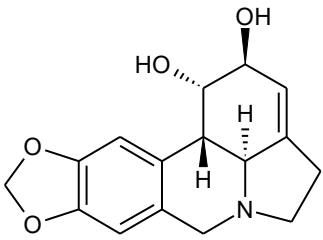
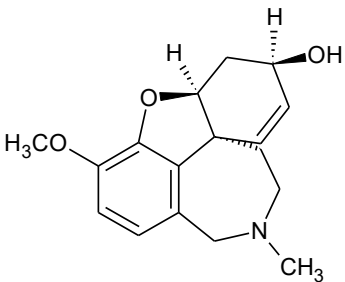
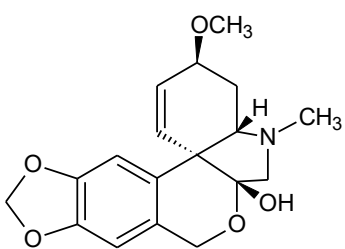
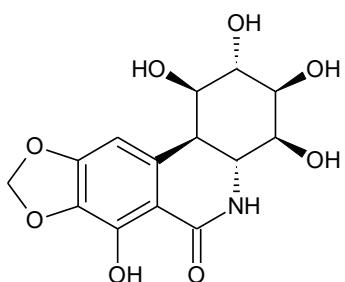
Rozlišujeme devět základních skupin, jejichž název je odvozen od hlavního zástupce skupiny (uveden v závorce) a patří sem lykorinový (lykorin), galantaminový (galantamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthamin), krininový (krinin), montaninový (montanin) a belladinový (belladin) typ<sup>18</sup> (Tab. 2).

Jak již bylo řečeno, alkaloidy této rostlinné čeledi vznikají speciální norbelladinovou cestou. Syntéza vychází ze dvou aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu, dekarboxylací L-tyrosinu vzniká tyramin, L-fenylalanin je nejprve přeměněn na kyselinu skořicovou a následně na 3,4-hydroxybenzaldehyd. Tyto dva meziprodukty podléhají kondenzační reakci a vzniká meziprodukt typu Schiffovy baze. Dále syntéza pokračuje přes norbelladin až konečně vznikne hlavní prekurzor 4'-O-methylnorbelladin. Následuje klíčový krok biosyntézy alkaloidů Amaryllidaceae a tím je cyklizace 4'-O-methylnorbelladinu, která může probíhat třemi různými způsoby. A právě z důvodu rozdílné cyklizace vznikají různé alkaloidní skelety. Prvním možným spojením je *para – ortho'*, kterým vzniká galantaminový typ alkaloidů. Druhá možnost je *para – para'* spojení, charakteristické pro typ haemanthaminový, krininový, pankratistatinový a tazettinový. Poslední možností je spojení *ortho – para'*, kdy vzniká lykorinový nebo homolykorinový typ alkaloidů<sup>17,18</sup>.



**Obrázek 5:** Biosyntéza základních typů Amaryllidaceae alkaloidů dle Dalecká et al. (2013)<sup>18</sup>, převzato a upraveno.

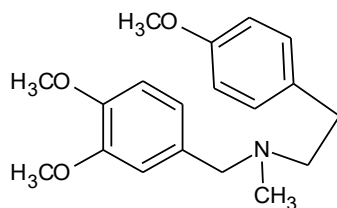
**Tabulka 2:** Přehled základních strukturních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, hlavní zástupci a rody, ze kterých byly izolovány<sup>3,19</sup>

Strukturní typ	Hlavní zástupce	Rod
Lykorinový		Lycorin <i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancratium</i> <i>Zephyranthes</i>
Galantaminový		Galantamin <i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <i>Habranthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancratium</i> <i>Zephyranthes</i>
Tazettinový		Tazettin <i>Clivia</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Lapiedra</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Zephyranthes</i>
Pankratistatinový		Pankratistatin <i>Boophane</i> <i>Haemanthus</i> <i>Narcissus</i> <i>Pacratium</i>

Homolykorinový		Homolykorin	<i>Galanthus</i> <i>Habranthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>
Haemanthaminový		Haemanthamin	<i>Ammocharis</i> <i>Boophane</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>
Krininový		Krinin	<i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>
Montaninový		Montanin	<i>Haemanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Lycoris</i> <i>Panocratium</i>

---

Belladinový

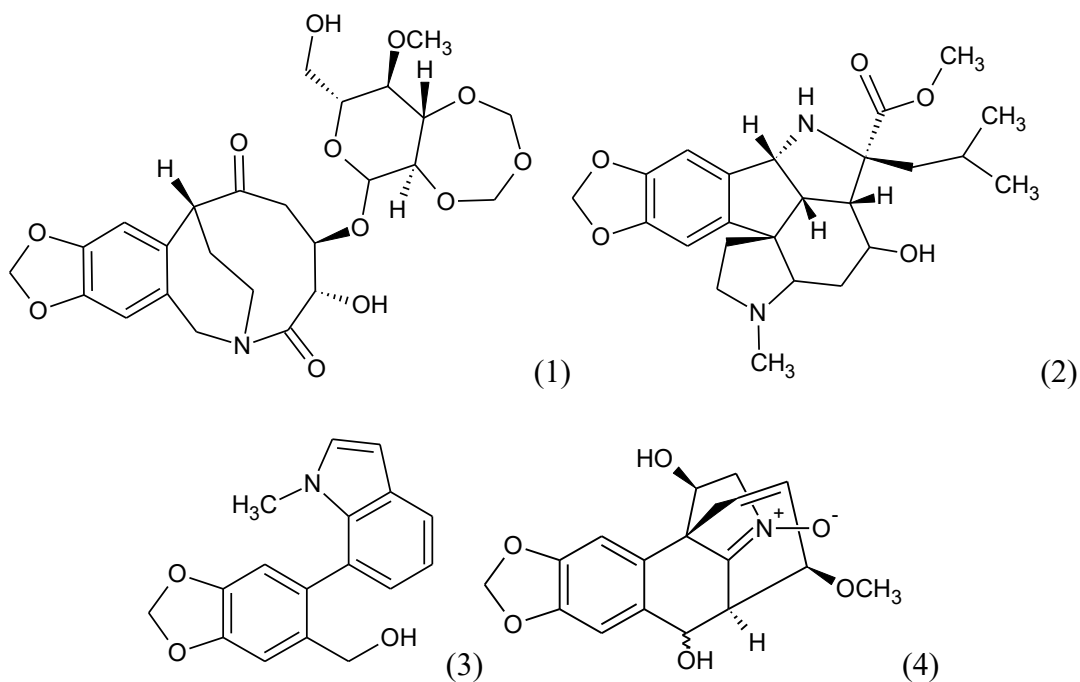


Belladin

*Crinum*  
*Galanthus*  
*Chlidanthus*  
*Nerine*

---

Z těchto základních skeletů vznikají pomocí specifických enzymů další struktury Amaryllidaceae alkaloidů<sup>17,18</sup>. Tyto strukturální typy jsou často prezentovány pouze jednou popsanou látkou, nebo je jejich výskyt vázán na jediný rostlinný rod či druh. Mezi další typy řadíme například typ kripowellinový, gracilaminový, galantindolový, hostasininový. Na následujícím obrázku (Obr. 6) jsou zobrazeny struktury nových alkaloidních zástupců zmíněných typů.



**Obrázek 6:** Vybraní zástupci – kripowellin A (1), gracilamin (2), galantindol (3), hostasinin (4)

## 3.2 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Jak již bylo zmíněno dříve, alkaloidy této rostlinné čeledi mají řadu významných biologických aktivit. Jmenovitě se jedná o protinádorovou, protivirovou, antibakteriální, antimykotickou, antimalarickou, analgetickou, cholinergní a antioxidační aktivitu<sup>3,4</sup>. Výčet aktivit není malý, a proto je tato skupina alkaloidů zkoumána a testována s cílem nalézt účinné a bezpečné látky, které by v budoucnosti našly své praktické využití.

### 3.2.1 Inhibice cholinesteráz v souvislosti s Alzheimerovou chorobou

Nejvýznamnější aktivitou této rostlinné čeledi je inhibice acetylcholinesterázy (AChE), která se v dnešní době prakticky využívá v léčbě Alzheimerovy choroby (AD). AChE je klíčový enzym rozkládající acetylcholin (ACh), který je součástí cholinerního systému. Nesprávné fungování tohoto systému vede k progresivnímu zhoršování paměti pozorované u AD.

Dalším studovaným cílem v terapii AD je inhibice enzymu butyrylcholinesterázy (BuChE) označované také jako pseudocholinesteráza, jejíž aktivita je za normálních podmínek v porovnání s AChE podstatně menší, ale v případě AD se její koncentrace patologicky zvyšuje a v pozdních stádiích choroby se stává převládající esterázou<sup>20</sup>.

Existuje velká spousta přírodních zdrojů, ze kterých byly inhibitory AChE a BuChE izolovány. Velký počet takovýchto sloučenin bohužel vykazuje pouze aktivitu v *in vitro* testech. Proto je důležité podrobit látky také testům *in vivo*, za účelem zjistit schopnost přecházet přes HEM (hematoencefalickou bariéru) a tak se dostat se na místo působení do mozku<sup>20</sup>.

#### 3.2.1.1 Demence

Demence je onemocnění mozku s obvykle chronickým a progresivním průběhem. Dochází ke ztrátě intelektových schopností, myšlení, orientace, ke změnám chování a poruchám osobnosti. Tyto poruchy významně ovlivňují pacientův společenský a pracovní život. Jedná se o onemocnění s vysokou mírou invalidity. Demence je velikou zátěží jak pro pacienty tak pro jejich rodinné příslušníky. V pokročilé fázi je pacientův život natolik ovlivněn, že je potřeba nepřetržitého dohledu a péče<sup>21,22</sup>.

##### 3.2.1.1.1 Epidemiologie

Populace v České republice stárne, což je dáno klesající porodností a snižující se úmrtností obyvatel. Dochází k prodlužování střední délky života a počet seniorů nám stoupá.

Vzhledem k tomu, že výskyt demence stoupá s věkem tak i počet pacientů s demencí přibývá. Ve věku nad 65 let trpí demencí 3 – 7 % běžné populace. V populaci seniorů nad 75 let trpí demencí přibližně 15 % a po 80. roce věku už 20 – 40 % osob<sup>21</sup>.

### **3.2.1.1.2 Rozdělení demencí**

Vznik demence má mnoho příčin, podle kterých je můžeme rozdělovat na:

1. Atroficko-degenerativní demence, které vedou ke snížení počtu nervových spojení, nervových buněk a poruše jejich funkce. Charakteristické je i ukládání patologických bílkovin, u kterých probíhají další patologické procesy. Mezi atroficko-degenerativní demence patří například Alzheimerova choroba, demence s Lewyho tělísky, Parkinsonova choroba.
2. Sekundární (symptomatické) demence mají za podklad celkové onemocnění – infekce, intoxikace, nádor, cévní poruchy a další poruchy zasahující mozek. Tyto demence jsou reverzibilní, pomocí včasné a správné diagnózy jsme schopni pacienta zcela uzdravit. Sekundární demence se dále dělí na:
  - a. demence vaskulární, které vznikají na podkladě poruchy mozkových cév a mozkového zásobení. Nejčastěji se jedná o mozkové infarkty, kdy dojde k odumření části mozkové tkáně v důsledku jejího nedostatečného prokrvení,
  - b. demence ostatní, které jsou způsobeny celkovým onemocněním postihující mimo jiné i mozek. Způsobují je intoxikace, infekce, záněty, úrazy hlavy, nádory mozku a další. Řadíme sem infekční, prionové, metabolické a jiné demence<sup>22</sup>.
3. Jako další skupinu uvedu demenci vyvolanou léky. Mezi léčiva schopná vyvolat poruchy kognitivních funkcí patří například indometacin, tramadol, benzodiazepiny, anticholinergní látky<sup>23</sup>.

Podle lokalizace postižení centrální nervové soustavy dělíme demence na kortikální, subkortikální a smíšené demence<sup>21</sup>.

### **3.2.1.2 Alzheimerova choroba**

#### **3.2.1.2.1 Definice**

Alzheimerova choroba (AD) je atroficko degenerativní onemocnění šedé kůry mozkové<sup>23</sup> zatím neobjasněné etiologie, jejímž hlavním znakem je postupně se rozvíjející demence. V současné době se řadí mezi nejčastější typ demence. Uvádí se, že tvoří 65 – 75 % všech demencí<sup>24</sup>. Z toho AD samotná představuje 50 – 60 % a minimálně 10 % tvoří demence

smíšené<sup>25</sup>. AD začíná s objevením prvních příznaků a končí smrtí. Doba trvání je 7 – 10 let. V dnešní době se AD řadí v příčinách úmrtí na 4. – 5. místo<sup>22</sup>.

### 3.2.1.2.2 Historie

AD nese jméno podle německého neuropatologa a psychiatra Aloise Alzheimer (1864 – 1915). Onemocnění popsal během let práce na klinice v Mnichově. Alzheimer na jedné konferenci vystoupit s kazuistikou ženy Auguste D., u které popsal „zvláštní onemocnění mozkového kortexu“, na které žena zemřela ve věku 51 let. Už 5 let před smrtí se u ženy objevovaly příznaky kognitivní disfunkce, které se zhoršovaly. Po patologicko-anatomickém prozkoumání mozku byla přítomna atrofie kortexu a přítomny byly tzv. senilní plaky a neurofibrilární klubka. Vzhledem k věku, kdy nemoc u ženy začala se dlouho myslelo, že se jedná o presenilní demence. Názory na AD byly sporné a jejich objasnění se podařilo až o pár let později<sup>24</sup>.

### 3.2.1.2.3 Etiopatogeneze

Makroskopicky dochází ke kortiko-subkortikální atrofii mozku, která je doprovázena rozšířením temporálních rohů postranních mozkových komor, přičemž stupeň atrofie obvykle odpovídá míře poškození kognitivních funkcí. Extracelulárně dochází k ukládání chorobně vzniklé bílkoviny  $\beta$ -amyloidu a následnému vzniku neuritických plaků, kolem kterých dochází k neurodegenerativním procesům. Tato bílkovina vzniká z tzv. amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za normálních podmínek pro funkci neuronů nezbytný. APP je štěpen enzymem  $\alpha$ -sekretázou na kratší rozpustné fragmenty, které se podílejí na plasticitě nervových buněk a zajišťují jejich ochranu. Při AD je APP patologicky štěpen enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázou, které tvoří delší nerozpustné fragmenty. Tyto fragmenty následně koagulují za vzniku  $\beta$ -amyloidu, ze kterého se formují senilní plaky podporující rozvoj sterilního zánětu. Intracelulárně dochází k degeneraci bílkoviny tzv. tau-proteinu, který je fyziologicky přítomen v mikrotubulech nervových buněk. U AD se vlákna tau-proteinu uvolňují a vytváří dvoušroubovici, která následně tvoří neurofibrilární klubka (tangles). Takto postižené neurony nemůžou vykonávat svou funkci a podléhají apoptóze<sup>24</sup>.

Kromě tvorby patologických bílkovin dochází ke změně funkce neuromediátorů. Nejvíce je postižen cholinergní systém, ve kterém dochází k degeneraci cholinergních neuronů. Enzymu cholinacetyltransferázy zodpovědné za syntézu ACh z cholinu a acetylkoenzymu A ubývá, přičemž AChE odbourávající acetylcholin zůstává aktivní. AChE se vyskytuje ve dvou formách jako převládající tetramer G4 a monomer G1, jehož

koncentrace je u AD zvýšena. Dále se u AD začíná v mozku patologicky zvyšovat množství BuChE, která se v pozdních stádiích choroby stává převládajícím enzymem.

Další narušený systém je systém excitačních aminokyselin, ve kterém postupně dochází k jejich nadměrnému uvolňování (glutamát, aspartát). Glutamát je důležitá aminokyselina fungující v mozku jako neuromediátor. Při zvýšení hladin těchto aminokyselin nastává hyperexcitace *N*-methyl-*D*-aspartátových receptorů (NMDA receptorů), což je spojeno se zvýšeným vstupem vápníku do nervových buněk. Toxický vliv vápníku vede k nesprávné funkci nervových buněk a k jejich následné apoptóze. Nesprávné fungování tohoto systému se nejvíce projeví ve schopnosti učit se novým informacím.

Dalším problémem je nadměrný vznik volných radikálů. Za normálního stavu je tvorba a odbourávání kyslíkových radikálů v rovnováze, ale při AD je schopnost odbourávání snížena. Z tohoto důvodu vzniká oxidativní stres, dochází k inaktivaci enzymů a poškozování buněk<sup>22,24,25</sup>.

Významnou roli v AD hraje genetika. Familiární forma se vyskytuje v 5 – 10 % z celkového počtu případů AD. Familiární forma je prokázána u pacientů, u kterých propukne nemoc dříve. Tato forma je spojována s mutací genu pro APP a dále s mutací genu pro transmembránový protein presenilin. Dalším genetickým rizikem je mutace genu APOE, který kóduje vznik apolipoproteinu E (apoE). Předpokládá se, že APOE ovlivňuje vnímavost k pozdní formě AD<sup>24</sup>.

#### **3.2.1.2.4 Klinický obraz**

AD pomalu, nenápadně a plíživě začíná postihovat kognitivní funkce pacienta. Kvůli nenápadnému nástupu je složité nemoc včas odhalit a z počátku je AD diagnostikována jako mírná porucha poznávacích funkcí<sup>22</sup>. První příznaky se mohou projevit jako malé změny v chování, nemocný přestává být aktivní, spíše se snaží izolovat a jeho paměťové funkce se zhoršují. Poruchy kognitivních funkcí jsou někdy patrné už od začátku, jindy se vyvíjí v průběhu nemoci. Jako první je narušena krátkodobá paměť a vstřípivost – nemocný si nedokáže zapamatovat nové věci, na druhou stranu dlouhodobá paměť bývá zachována relativně dlouho. S postupem onemocnění dochází ke ztrátě emocí, pacient bývá depresivní, jindy může být přítomna euforie, ani výskyt halucinací nebývá výjimkou. Postupně dochází ke změně osobnosti, k otupění, ztrátě zájmů, nemocný se o sebe nedokáže postarat, ztrácí hygienické návyky a je odkázán na pomoc druhých<sup>23</sup>.

### 3.2.1.2.5 Stádia Alzheimerovy choroby

Lehké stádium demence se vyznačuje mírnými poruchami, a to hlavně poruchami krátkodobé a střednědobé paměti. Problémem je zapamatování si nových informací, může se objevit i porucha orientace. Vzhledem k faktu, že pacient ví, že má problém se často objevují deprese a poruchy nálady<sup>22</sup>. V tomto stádiu je pacient schopen žít relativně samostatným životem a je schopen se o sebe postarat<sup>26</sup>.

U středního stádia demence dochází k dalšímu zhoršování paměti. Pacient je dezorientován jak v čase tak v prostoru, často se neorientuje ani na známých místech. Poruchy řeči a paměti nemocného omezují při provádění běžných denních činností. Pacient se o sebe nedokáže zcela postarat, a proto je nutný neustálý dohled.

Těžké stádium demence je charakteristické ztrátou soběstačnosti, pacient je dezorientován, nepoznává příbuzné, předměty a později ani sám sebe. Porucha řeči je natolik pokročilá, že se vyjadřuje jedním slovem nebo několika málo slovy. Později dochází k inkontinenci a úniku stolice, trvalá ošetrovatelská péče je nutností<sup>21</sup>.

### 3.2.1.2.6 Diagnostika

Včasné a správné odhalení nemoci je základ pro zahájení léčby, přičemž stanovení diagnózy není zcela jednoduché. Příznaky onemocnění jsou často mylně připisovány stáří pacienta a označovány jako stařecká demence, kdy příznakům není věnována dostatečná pozornost. Náznaky připomínající demenci by se neměly podceňovat a stav pacienta by měl být podložen lékařskou diagnózou, která se skládá z pečlivé osobní anamnézy a anamnézy dalšího člověka. Pacient trpící demencí si svůj stav často nemusí uvědomovat, a proto pohled další osoby, nejčastěji někoho z rodiny, je velice důležitý. Provádí se fyzikální vyšetření, při kterém se hodnotí kognitivní funkce – nejčastěji používaným testem je MMSE (Mini-Mental State Examination) česky krátká škála mentálního stavu, která hodnotí kognitivní funkce pacienta. V testu lze získat maximálně 30 bodů, přičemž za každou úspěšně zodpovězenou otázku se přičítá jeden bod. Výsledek 25 a méně bodů může poukazovat na počínající demenci. Dalším užitečným ukazatelem je test hodin. Zobrazovací metody jako je počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR) odhalují morfologické odchylky, tj. úbytek mozkové tkáně a změny prokrvení. Zobrazovací metody založené na radioaktivně značené látce tomografická scintigrafie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET) hodnotí mozkový metabolismus, krevní průtok mozku a aktivitu neurotransmiterů<sup>21,22</sup>.

### 3.2.1.2.7 Terapie Alzheimerovy choroby

Přesná příčina AD není zatím zcela objasněna a kauzální léčba není z tohoto důvodu možná. Léčba má pouze symptomatický charakter s cílem co nejvíce zpomalit progresi onemocnění.

V současnosti jsou v terapii AD používány dvě skupiny látek – inhibitory mozkových cholinesteráz (galantamin, rivastigmin, donepezil) a inhibitory glutamatergních receptorů (memantin)<sup>5</sup>. Použití zmíněných látek je založeno na důkazech (EBM).

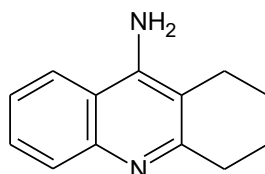
Evidence based medicine (medicína založená na důkazech) je „vědomé, zřetelné a soudné používání nejlepších současných důkazů při rozhodování o péči o jednotlivé pacienty“<sup>27</sup>.

#### 3.2.1.2.7.1 Inhibitory cholinesteráz

Inhibitory cholinesteráz jsou léky první volby v terapii lehkých a středních forem AD. Uplatnění nachází u demence s Lewyho tělísky a dalších druhů demencí. Je prokázáno, že zlepšují kognitivní i nekognitivní funkce (hlavně poruchy chování) a oddalují nástup těžkého stádia AD průměrně o dva roky<sup>28</sup>. Označují se jako kognitiva<sup>5</sup>, jejichž mechanismus účinku zahrnuje inhibici AChE event. BuChE, čímž snižují degradaci acetylcholinu v CNS a tím upravují cholinergní transmissi. Dále pak dochází ke snížení tvorby a toxicity  $\beta$ -amyloidu, čímž je ovlivněn i samotný neurodegenerativní proces nemoci<sup>5,21</sup>.

Dnes jsou používány jako inhibitory cholinesteráz tři látky – galantamin, rivastigmin a donepezil, které jsou určeny pro terapii lehkého a středně těžkého stádia nemoci<sup>29</sup>. Zdravotní pojišťovny hradí léčiva, pokud se výsledek MMSE testu pohybuje v rozmezí 20 - 13 body. V mnoha zemích je terapie hrazena již při výsledku testu 24 bodů, což je výhodné z důvodu včasné zahájení léčby<sup>5</sup>.

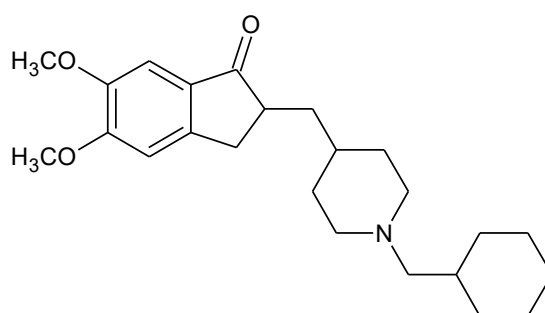
Prvním povoleným inhibitorem AChE pro léčbu AD s akridinovým skeletem byl takrin (Obr. 7). Bohužel byl brzy stažen z trhu z důvodu hepatotoxicity a gastrotoxicity. Deriváty takrinu jsou nadále zkoumány se snahou najít méně toxickou látku, která by se mohla v budoucnu uplatnit v léčbě AD<sup>30</sup>.



Obrázek 7: Struktura takrinu

### Donepezil (ADONEP<sup>®</sup>, ALZIL<sup>®</sup>, ARICEPT<sup>®</sup>, DONEPEZIL ACTAVIS<sup>®</sup>)

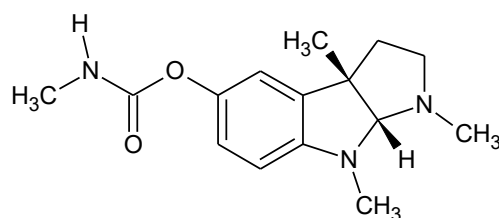
Donepezil (Obr. 8) je selektivní reverzní nekompetitivní inhibitor AChE bez významné schopnosti ovlivnit BuChE. Mimo inhibiční schopnosti brání ukládání beta-amyloidních plaků v CNS, má antioxidační účinky a neuroprotektivní efekt. Má výbornou biologickou dostupnost, snadno přechází přes mozkovou bariéru a díky dlouhému biologickému poločas (přes 70 hodin) se podává jednou denně. Léčivo je dostupné v 5 a 10 mg dávkách, kdy s dávkou 5 mg se začíná a během několika týdnů se dostáváme na dávku 10 mg jednou denně. Léčivo je většinou dobře snášeno a má minimální množství nežádoucích účinků, mezi které patří gastrointestinální obtíže jako je nevolnost, průjem, bolesti břicha<sup>5,31,32</sup>.



**Obrázek 8:** Struktura donepezilu

### Rivastigmin (EXELON<sup>®</sup>, NIMVASTID<sup>®</sup>, RIVASTIGMIN ACTAVIS<sup>®</sup>)

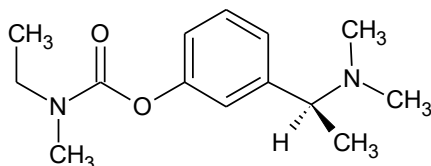
Rivastigmin je syntetická látka, která vznikla na základě struktury fysostigminu (eserinu) (Obr. 9). Fysostigmin je alkaloid izolovaný ze semen *Physostigma venenosum* (Fabaceae), který se používá v Africe jako rituální jed. Působí jako reverzibilní inhibitor obou cholinesteráz s vyšší selektivitou pro AChE. Bohužel jeho vlastnosti jako je krátkodobé působení a úzké terapeutické okno brání tomu, aby se dal použít v léčbě AD<sup>20</sup>.



**Obrázek 9:** Struktura fysostigminu

Rivastigmin (Obr. 10) je reverzibilní kompetitivní inhibitor cholinesteráz, jehož struktura je odvozena od kyseliny karbamové. Váže se přímo na aktivní místo esterázy. Na rozdíl od donepezilu inhibuje oba typy esteráz – AChE a BuChE. Při perorálním podání se

užívá 2× denně s počáteční dávkou 2× denně 1,5 mg, která se každý měsíc postupně navyšuje až do dávky 2× denně 6 mg. Nežádoucí účinky se odvíjí od cholinergního působení – patří sem nevolnost, průjem, nechutenství. Pro zmírnění nežádoucích účinků je možné použít náplast s rivastigminem. Rivastigmin se kromě terapie AD využívá v terapii Parkinsonovy demence<sup>5,31,32</sup>.

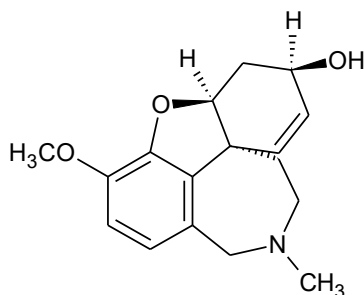


**Obrázek 10:** Struktura rivastigminu

### **Galantamin** (REMINYL<sup>®</sup>, GALANTAMIN MYLAN<sup>®</sup>)

Galantamin (Obr. 11) je významnou látkou čeledi Amaryllidaceae, patříci do galantaminového strukturního typu. Jedná se o terciární alkaloid původně izolovaný z cibule sněženky *Galanthus woronowii*<sup>33,34</sup>. S postupem času se izolace prováděla i z dalších rodů z čeledi Amaryllidaceae (Tab. 2). Galantamin má řadu důležitých účinků. Po polovině 20. století se začal využívat v terapii myasthenia gravis a paralytické poliomyelitidy. Je to látka schopná antagonizovat nervosvalovou blokádu způsobenou kurarovými látkami. Dále působí proti dechovému útlumu navozeného opiáty. Antagonizuje anticholinerní syndrom navozený skopolaminem a také má některé z centrálních účinků droperidolu a diazepam<sup>34,35</sup>.

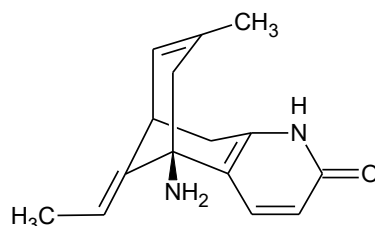
Dnes je jeho nejvýznamnější role v terapii AD. Působí duálním mechanismem. Na jedné straně kompetitivně a reverzibilně inhibuje enzym AChE, čímž zvyšuje hladinu ACh, druhá role je schopnost působit jako alosterický modulátor nikotinových receptorů a tím zesilovat vlastní účinek ACh<sup>36</sup>. Je používán ve formě soli (galantamin hydrobromid) vyznačující se dobrým vstřebáváním a vysokou biologickou dostupností<sup>38</sup>. Podává se perorálně 1× nebo 2× denně s počáteční denní dávkou 8 mg (event. 2 × 4 mg), která je postupně titrována do dávky 24 mg (event. 2 × 12 mg) denně<sup>5</sup>.



**Obrázek 11:** Struktura galantaminu

## Huperzin A

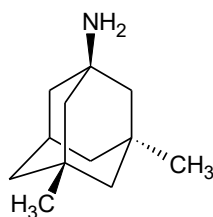
Huperzin A (Obr. 12) je alkaloid poprvé izolovaný z rostliny *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae). Rostlina je dlouhá léta používána v rámci tradiční čínské medicíny pro své antipyretické a protizánětlivé účinky, uplatnění má i v terapii schizofrenie. Tyto účinky jsou vázány na celou rostlinu a obsahové alkaloidy. Huperzin A samotný těmito účinky nedisponuje, ale vykazuje účinky neuroprotektivní. Huperzin A působí jako silný inhibitor AChE, který selektivně inhibuje její G4 formu, čímž se liší od ostatních inhibitorů AChE, kteří inhibují spíše formu G1. Vykazuje schopnost zvýšit hladinu ACh 2 – 8krát oproti ostatním inhibitorům a má dlouhodobější efekt než donepezil a rivastigmin. Výhodou je dobrý přestup přes HEM, dobrá biologická dostupnost a také nízké terapeutické dávkování. Kromě huperzinu A existuje i huperzin B, který má širší terapeutický index, ale menší selektivitu a menší afinitu k AChE než huperzin A. Huperzin A se jeví jako velice nadějná látka, a proto se i výzkum zaměřuje na hledání jeho derivátů se snahou získat ještě více aktivní látky<sup>35,38</sup>.



**Obrázek 12:** Struktura huperzinu A

### 3.2.1.2.7.2 Inhibitory NMDA receptorů

Zatím jediná klinicky používaná látka této skupiny je memantin (AXURA<sup>®</sup>, EBIXA<sup>®</sup>). Memantin (Obr. 13) je antagonist NMDA receptorů. Tímto mechanismem brání neurotoxickému působení glutamátu, působí proti tvorbě beta-amyloidu a tau-proteinu. Je prokázána účinnost memantinu v terapii střední a těžké demence. Snášenlivost memantinu bývá dobrá. Nežádoucí účinky zahrnují nespavost, závratě a únavu<sup>28</sup>. Pojišťovny v ČR hradí léčivo pokud je výsledek MMSE 17 – 6 bodů<sup>5</sup>. Memantin může být podáváný v monoterapii nebo v kombinaci s inhibitory AChE<sup>29</sup>.



**Obrázek 13:** Struktura memantinu

### 3.2.1.2.7.3 Další možnosti současné terapie

Účinnost dále uvedených látek je podpořena malým množstvím důkazů nebo důkazy chybí úplně<sup>5</sup>. Extractum ginko biloba vykazuje kombinovaný efekt – zlepšuje metabolické pochody mozku, má antioxidační působení, inhibuje destičkový agregační faktor. Je vhodná jako podpůrná terapie k inhibitorům cholinesteráz a memantinu. Nicergolin slabě inhibuje cholinesterázy a zlepšuje uvolňování ACh, rovněž je vhodný jako podpůrná terapie ke schváleným léčivům. Antioxidanty (vitamin E) pomáhají odstraňovat volné kyslíkové radikály, které se u AD tvoří ve větší míře. Nootropika jsou látky zvyšující mozkový metabolismus a tím podporují mozkovou činnost (piracetam, pyritinol). Hydrolyzát vepřových mozků cerebrolysin patří mezi prekurzory nervových růstových faktorů, u kterého se předpokládá možnost náhrady přirozených nervových růstových faktorů, jejichž počet je při AD snížen, ale jednoznačný důkaz o jeho účinnosti nemáme. Dále se setkáváme s inhibitory monoaminoxidázy typu B (selegilin), u kterých se předpokládá schopnost vychytávání volných radikálů a podpora procesu učení. Pozornost je věnována i estrogenům jako látkám zlepšující prokrvení mozku<sup>5,25</sup>.

### 3.2.1.2.7.4 Možnosti budoucí terapie

V současné době probíhají klinické studie látek, které mají naději být v budoucnosti vhodnými léčivy v terapii AD. Studují se látky, které se vyznačují protiamyloidním působením. Látky můžeme označit jako potenciálně chorobu modifikující látky a řadíme sem imunoterapii, látky inhibující sekretázy, látky snižující agregaci  $\beta$ A a dále látky působící proti ukládání  $\beta$ A<sup>39</sup>.

#### Imunizace

Jednou z možností je imunizace. Bylo zjištěno, že aktivní a pasivní imunizací dochází k snížení již vzniklého  $\beta$ A, na základě tohoto poznání byla provedena studie na pacientech, kdy byla testována látka s označením AN1792. Látka prokazatelně snižuje ukládání amyloidních plaků a zlepšuje kognitivní funkce<sup>40</sup>. Bohužel u 6 % testovaných se vyvinula autoimunitní meningoencefalitida, která vedla k zastavení studie<sup>39</sup>. I přes zastavení studie s AN1792 zůstává imunizace stále perspektivní cestou k nalezení nových potenciálních léčiv v terapii AD.

V současnosti se ve fázi vývoje nachází více než deset látek pro aktivní a pasivní imunizaci<sup>40</sup>. Pasivní imunizace udržuje hladinu protilátek působící proti  $\beta$ A (zabraňují jeho ukládání). Látky jsou podávány infuzně. Při tomto typu léčby je potřeba opatrnosti týkající se

možných nežádoucích účinků, které mohou být opožděné. Monoklonální protilátky v klinickém testování jsou například gantenerumab<sup>41</sup>, crenezumab<sup>42</sup> a solanezumab<sup>43</sup>.

Další možností imunizace jsou injekce intravenózního imunoglobulinu (IvIg). Jedná se o směs přirozených lidských imunoglobulinů včetně protilátek proti  $\beta$ A. Studie dokazují, že tato metoda působí proti ukládání  $\beta$ A a neuroprotektivně<sup>44</sup>.

### **Inhibitory sekretáz**

Inhibitory  $\gamma$ -sekretáz a  $\beta$ -sekretáz můžeme označit jako potenciálně chorobu modifikující látky. Látky by měly mít schopnost bránit vzniku  $\beta$ A a následné neuropatologii. Bylo identifikováno mnoho sloučenin, které jsou schopné inhibovat  $\gamma$ -sekretázy v mozku. Ovšem  $\gamma$ -sekretázy, mimo patologické štěpení APP, plní mnoho fyziologických funkcí. Významná fyziologická funkce je vazba na Notch receptor, který je důležitý při proliferaci a diferenciaci buněk. V jedné studii prováděné na myších byla prokázána účinnost snižovat množství  $\beta$ A, ale použitá dávka vykazovala nežádoucí účinky – narušení diferenciaci lymfocytů, změna střevních buněk a zhoršení paměti. Tyto nežádoucí účinky se odvíjí z neselektivního působení, tj. z neschopnosti  $\gamma$ -sekretázy navázat se na Notch receptor<sup>39</sup>. Takto působící látky vykazují účinnost, ale bohužel jsou toxické<sup>5</sup>.

Modulátory  $\alpha$ -sekretáz (SALAs – selective  $\beta$ A lowering agents) jsou velice nadějně látky s nízkou toxicitou. Působí selektivně, cílí pouze na tu část  $\gamma$ -sekretázy, která je zodpovědná za štěpení APP. Je zkoušena látka tarenflurbil (R-flurbiprofen), který na rozdíl od S-flurbiprofenu a dalších NSAIDs neinhibuje COX I ani COX II, a proto nevykazuje gastrotoxicitu<sup>39</sup>.

Inhibitory  $\beta$ -sekretáz (BACE –  $\beta$ -site APP cleaving enzym) jsou také zkoušeny. Látky z této skupiny se zdají být bezpečné, ale bohužel vykazují malou účinnost<sup>5</sup>.

### **Antiagregační $\beta$ A látky**

Tramiprosad je glykosaminoglykanové mimetikum s malou molekulou. Glykosaminoglykan se váže na rozpustný  $\beta$ A a tím podporuje vznik fibril a tvorbu amyloidních plaků. Tramiprosad s ním kompetuje o místo a má tedy opačné účinky<sup>45</sup>. Do této skupiny dále patří colostrinin, který je stále studován a clioquinol, který byl stažen z důvodu myelosprese<sup>39</sup>.

### **Inhibitory GSK-3 $\beta$**

Další zkoumané látky jsou inhibitory enzymu glykogensynthasy kinasy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Při AD je zvýšená aktivita enzymu GSK-3 $\beta$ , který je zodpovědný za patologickou

hyperfosforylaci tau-proteinu a následného vzniku neuronálních klubek (tangles). Předpokládá se, že pokud dojde k zablokování tohoto enzymu mělo by dojít ke snížení fosforylace tau-proteinu a poklesu vzniku tangles<sup>46</sup>. Na tuto aktivitu je zkoušeno například lithium. Lithium používané v terapii bipolární poruchy by mohlo být přínosem i v terapii neurodegenerativního onemocnění<sup>47</sup>.

### **Ostatní**

Nesteroidní antiflogistika, statiny a agonisté gonadotropin-uvolňujícího hormonu se studují pro možný přínos v terapii AD<sup>39</sup>. Existují důkazy o tom, že dlouhodobé užívání NSAID působí protektivně proti AD. U indometacinu bylo zjištěno, že zlepšuje kognitivní funkce, ale z důvodu gastrotoxicity se nedá v dlouhodobé terapii využít. Další nežádoucí účinek NSAID je kardiotoxicita a z tohoto důvodu musela být pozastavena další studie (naproxen, celecoxib). Omezit nežádoucí gastrotoxicitu se podařilo u nitroflurbiprofenu, který má potenciál dobře pronikat přes hematoencefalickou bariéru a zlepšovat kognici. Nitroflurbiprofen je nadále zkoumán. Pacienti léčení statiny mají pravděpodobně nižší riziko vzniku AD. Statiny zvyšují aktivitu  $\alpha$ -sekretáz, čímž podporují fyziologické štěpení APP na rozpustné produkty. Na zpomalení AD se dále navíc uplatňuje jejich protizánětlivý efekt a schopnost snižovat hladinu cholesterolu<sup>5,39</sup>.

### **3.2.2 Závislost cholinergní aktivity na strukturním typu Amaryllidaceae alkaloidů**

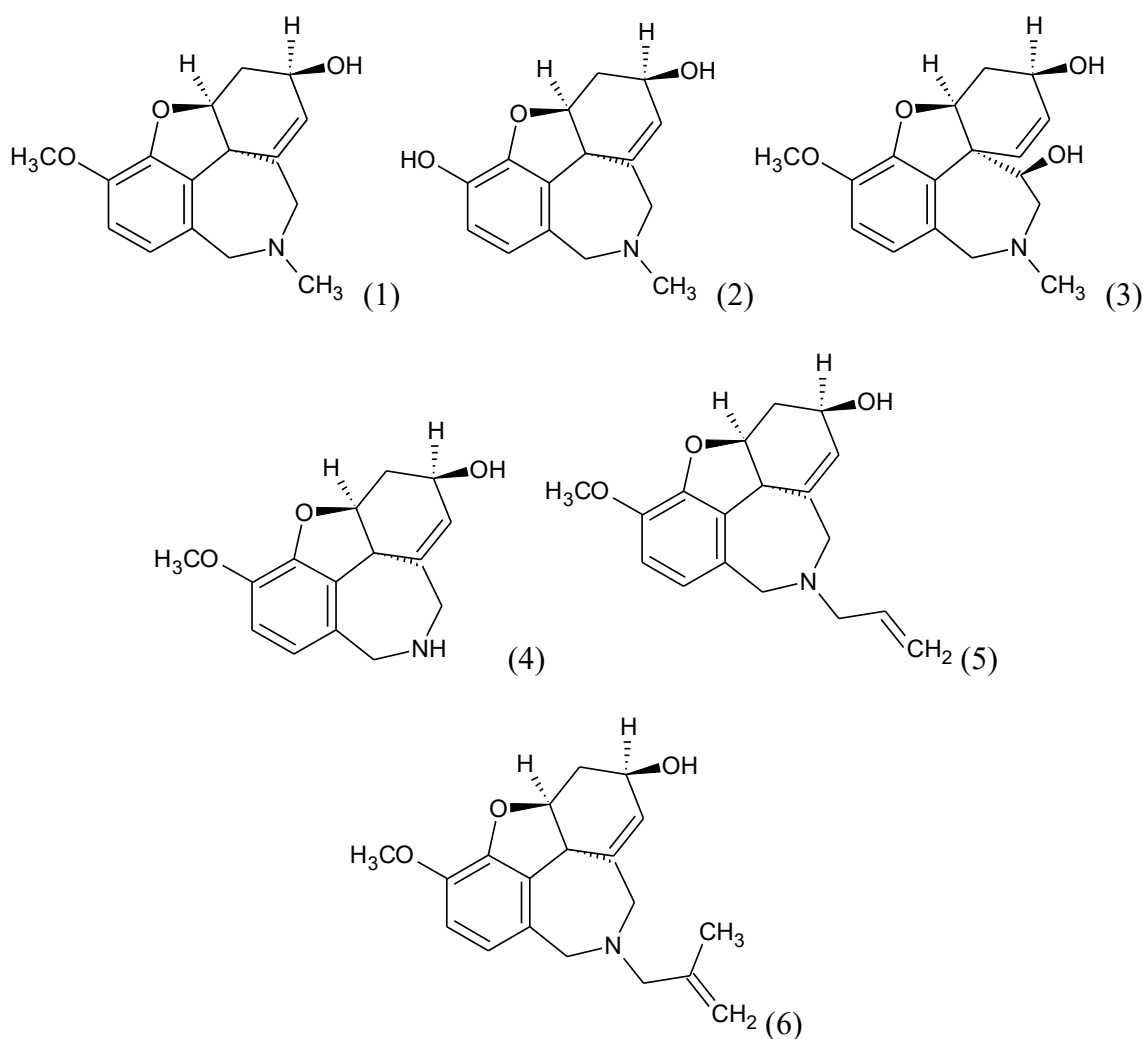
Schopnost inhibovat AChE je spjatá pouze s některými strukturními typy diskutovaných alkaloidů, převážně s typem galantaminovým a lykorinovým, ale ne s haemanthaminovým, homolykorinovým a tazzetinovým. U krininového typu je uváděná slabá inhibiční schopnost<sup>48</sup>.

Největší acetylcholinesterázová inhibiční aktivita je spojována s galantaminovým strukturním typem a jeho nejvýznamnějším zástupcem galantaminem, který je už nějakou dobu používán v terapii AD. Galantamin je důkladně prozkoumán, a proto je dnes používán jako standard, s kterým se srovnávají ostatní látky testované na biologickou inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám<sup>35</sup>(Tab. 3).

Kromě již zmíněného galantaminu do galantaminového strukturního typu patří další významné látky (Obr. 14), kterými jsou sanguinin a 11-hydroxygalantamin. Sanguinin (9-*O*-demethylgalantamin) vykazoval 10krát větší potenciál inhibovat AChE než galantamin. Aktivita sanguininu je připisována hydroxylové skupině, která se nachází

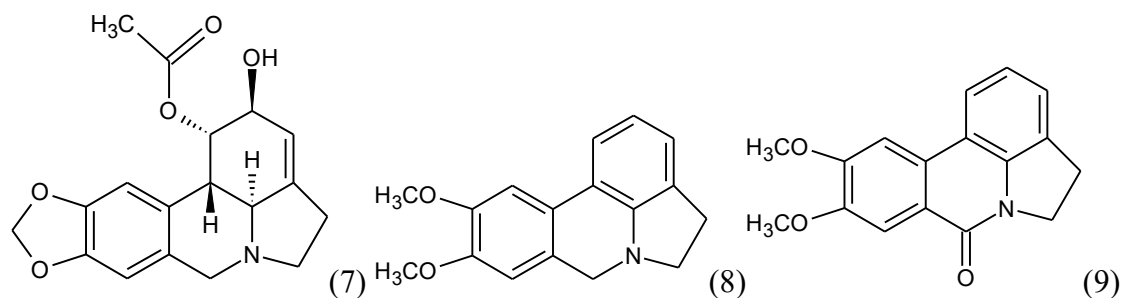
na místě methoxyskupiny ve struktuře galantaminu a díky ní se molekula může lépe navázat na AChE. Alkaloid 11-hydroxygalantamin vykazuje přibližně stejný inhibiční potenciál jako galantamin. U epinorgalantaminu je popisován účinek nižší. Polohový izomer galantaminu chlidathin je 100krát méně účinný. Rozdílný účinek je připisován tvorbě intramolekulárních vodíkových vazeb mezi hydroxylem na uhlíku C3 a kyslíkem v dihydrofuranovém kruhu<sup>20,36</sup>. Přítomnost allylové části na atomu dusíku také výrazně zvyšuje účinek. To bylo dokázáno u látek *N*-allylnorgalanthaminu a *N*-(14-methylallyl)norgalanthaminu izolovaných z *Leucojum aestivum*. Obě látky vykazovaly vyšší inhibiční účinek oproti galantaminu<sup>49</sup>.

Ne všechny alkaloidy patřící do galantaminového strukturního typu vykazují významnou inhibici AChE. Látky jako je lykoramin nebo epinorlykoramin inhibiční účinek buď nevykazovaly nebo byl pouze slabý. Ztráta inhibičního potenciálu je vysvětlována odlišným prostorovým uspořádáním molekul v důsledku přítomné dvojně vazby v C kruhu<sup>20</sup>.



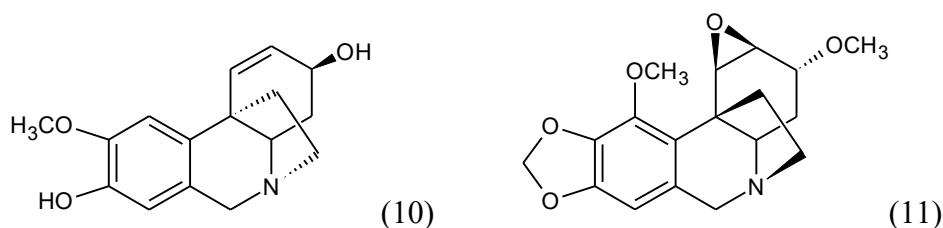
**Obrázek 14:** Alkaloidy galantaminového typu s acetylcholinesterázovou inhibiční aktivitou, galantamin (1), sanguinin (2), 11-hydroxygalantamin (3), epinorgalantamin (4), *N*-allylnorgalanthamin (5), *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin (6)

Lykorinový typ je obecně méně inhibičně aktivní než typ galantaminový, ovšem i tyto látky vykazují zajímavé aktivity. Zde je inhibiční aktivita spjata se substitucí na uhlíku C1 a C2<sup>36</sup>. Mezi alkaloidy lykorinového typu je významný 1-*O*-acetyllykorin, který byl 2krát více aktivní než galantamin. Dále aktivitu vykazovaly assoanin a oxoassonin. Účinnost je připisována aromatickému C kruhu ve strukturách assoaninu a oxoassoninu a v případě 1-*O*-acetyllykorinu přítomnosti hydroxy a acetoxy skupiny na C1 a C2 uhlících<sup>20</sup> (Obr. 15).



**Obrázek 15:** Alkaloidy lykorinového typu s acetylcholinesterázovou inhibiční aktivitou, 1-*O*-acetyllykorin (7), assoanin (8), oxoassonin (9)

Tvrzení, že krininový typ alkaloidů disponuje jen slabou aktivitou, popírají látky (Obr. 16) izolované z rostlin *Zephyranthes robusta* BAKER a *Chlidanthus fragrant* Herb. 8-*O*-Demethylmaritidin ( $57,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) a undulatin ( $7,4 \pm 0,003 \mu\text{M}$ ) patří do krininového typu ukazují zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE elektrického úhoře. Dále byla testována schopnost těchto dvou látek přecházet před HEM a tím dosáhnout místa účinku. Bylo zjištěno, že undulatin je schopný pasivně přecházet přes HEM<sup>50</sup>.



**Obrázek 16:** Alkaloidy krininového typu s acetylcholinesterázovou inhibiční aktivitou, 8-*O*-demethylmaritidin (10), undulatin (11)

Inhibice enzymu butyrylcholinesterázy je dalším cílem v terapii AD. BuChE hraje významnou roli v procesu AD a to hlavně v pozdějších stádiích, kdy množství enzymu roste. Počet testovaných látek na inhibiční aktivitu proti BuChE není tak velký jako v případě inhibice AChE, proto jsou informace omezené. Většina studií zaměřující se na inhibiční aktivitu alkaloidů čeledi Amaryllidaceae je spojená s naší laboratoří, ale doposud se nepodařilo izolovat látky se zajímavou BuChE inhibiční aktivitou.

**Tabulka 3:** AChE inhibiční aktivita vybraných alkaloidů vyjádřená jako IC<sub>50</sub>

Alkaloid	Strukturní typ	IC <sub>50</sub> [μM]
Sanguinin <sup>36</sup>	Galantaminový	0,10 ± 0,01
Galantamin <sup>36</sup>	Galantaminový	1,07 ± 0,18
11-Hydroxygalantamin <sup>36</sup>	Galantaminový	1,61 ± 0,21
Epinorgalantamin <sup>36</sup>	Galantaminový	9,60 ± 0,65
Lykoramin <sup>36</sup>	Galantaminový	456 ± 57
1- <i>O</i> -Acetylykolin <sup>36</sup>	Lykolinový	0,96 ± 0,4
Assoanin <sup>36</sup>	Lykolinový	3,87 ± 0,24
Oxoassoanin <sup>36</sup>	Lykolinový	47,21 ± 1,13
Undulatin <sup>50</sup>	Krininový	7,4 ± 0,03
8- <i>O</i> -Demethylmaritidin <sup>50</sup>	Krininový	57,4 ± 0,1

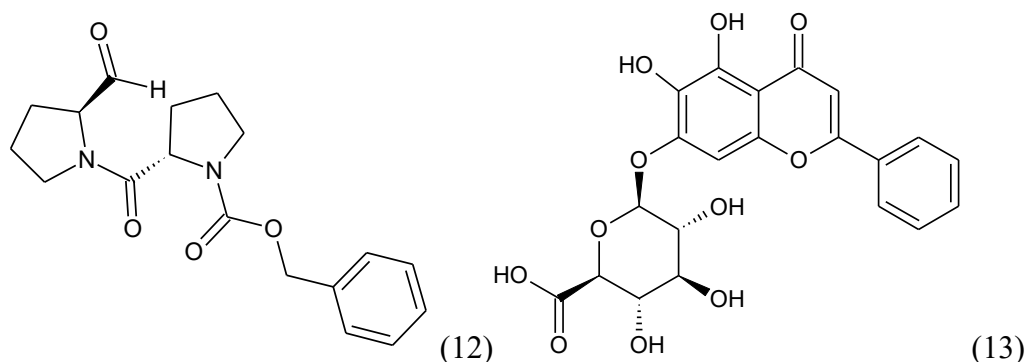
### 3.2.3 Inhibice prolyl oligopeptidázy

Prolyl oligopeptidáza (POP), také známá také jako prolyl endopeptidáza je serinová cytosolová peptidáza, která štěpí některé neuropeptidy obsahující aminokyselinu prolin (vasopresin, oxytocin, substanci P a další)<sup>51</sup>.

Inhibice POP je cílem v terapii schizofrenie, bipolární nemoci a při kognitivních poruchách provázející AD<sup>52</sup>.

U AD dochází k poklesu hladin neuropeptidů v kortikální oblasti a v hippocampu, které se podílejí na správné kognitivní funkci. Zdá se, že zvýšení hladiny neuropeptidů by mohlo zlepšit progresi neurodegenerativních nemocí jako je AD.

Provedené studie naznačují, že inhibicí POP by se zabránilo štěpení neuropeptidů, čímž by došlo ke zvýšení jejich hladin a zlepšení kognitivních funkcí. Látky jsou v současné době předmětem zkoumání. První účinný inhibitor POP byl *Z*-pro-prolinal - IC<sub>50, POP</sub> = 3,27 ± 0,02 mM<sup>51</sup>. Inhibici POP vykazuje také flavonoid bajkalin izolovaný z kořene rostliny *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae, šišák bajkalský). Jeho inhibiční aktivita je IC<sub>50, POP</sub> = 0,610 ± 0,02 mM. Obě látky (Obr. 17) se používají jako standardy při testování dalších látek<sup>52</sup>.



**Obrázek 17:** Struktury Z-pro-prolinalu (12) a bajkalinu (13)

### 3.2.4 Protinádorová aktivita

Nádorová onemocnění patří mezi civilizační choroby, které se řadí na druhé místo nejčastějších příčin úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních. Jejich společným rysem je abnormální regulace buněčného bujení a rozmnožování<sup>53</sup>. Mezi nejčastější nádory řadíme nádory plic, tlustého střeva, prsu, prostaty a žaludku. I když byly učiněny značné pokroky jak v pochopení rakoviny tak v samotné léčbě, počet nemocných pacientů stále narůstá. Nárůst rakoviny není spojen pouze se zvyšujícím se věkem populace, ale také v důsledku špatného životního stylu. Mezi rizikové faktory patří obezita, kouření, nadměrný příjem alkoholu a samozřejmě také stres<sup>54</sup>.

Terapie nádorových onemocnění zahrnuje kombinaci chirurgie, chemoterapie, radioterapie, transplantaci kostní dřeně, hormonální terapii a psychologické přístupy<sup>50</sup>. Problémem terapie nádorů je rezistence nádorových buněk k léčbě. Rezistentní buňky řídí růst nádoru a přispívají k šíření maligních buněk do dalších orgánů<sup>55</sup>.

Alkaloidy rostlin této čeledi mají kromě dalších účinků, účinky protinádorové se schopností indukovat apoptózu. Bylo zjištěno, že vykazují selektivitu k nádorovým buňkám, přičemž jejich toxicita k buňkám nenádorovým a klidovým je relativně nízká<sup>18,56</sup>. Protinádorová aktivita, stejně jako tomu bylo u inhibitorů AChE, je vázána na určité strukturní typy, významné účinky jsou spojovány s následujícími strukturními typy – lykorinový, pankratistatinový, krininový a haemanthaminový (Obr. 18).

Lykorinový typ alkaloidů se svým hlavním zástupcem lykorinem představuje cytotoxicky nejvýznamnější skupinu látek. Lykorin byl první látkou čeledi Amaryllidaceae izolovanou v roce 1877<sup>18</sup>. Detailní popis struktury lykorinu učinil o řadu let déle v roce 1956 Nagakawa a kol<sup>56</sup>. Byla provedena řada *in vitro* i *in vivo* studií zkoumající protinádorové účinky lykorinu a jeho derivátů<sup>4</sup>, přičemž lykorin výrazně zhoršuje proliferaci i migraci rakovinných buněk a jeho cytotoxická aktivita je přítomna bez ohledu na to, zda buňky jsou

citlivé či rezistentní k apoptóze<sup>56</sup>. Při testování cytotoxické aktivity lykorinu a jeho derivátů bylo použito 6 buněčných nádorových linií, z toho čtyři apoptóza-rezistentní, tj. U373 (astrocytální glioblastom), A549 (karcinom plic), OE21 (nádor jícnu), SKMEL-28 (melom-model) a dvě vykazovaly citlivost k apoptóze, tj. Hs683 (lidský anaplastický oligodendrogliom) a B16F10 (myši melanom). Dále byla hodnocena toxicita na normální a klidové buňky. Získané výsledky shrnuje následující tabulka (Tab. 4). Z výsledků je možné vyčíst, že lykorin má až 15× větší selektivitu k nádorovým buňkám než k buňkám normálním<sup>56</sup>.

**Tabulka 4:** *In vitro* inhibice růstu vybraných látek proti následujícím nádorovým liniím A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL, B16F10, vyjádřená IC<sub>50</sub> [μM]

Alkaloid	A549	OE21	Hs683	U373	SKMEL	B16F10
Lykorin <sup>56</sup>	4,3 ± 0,3	5,1 ± 0,4	6,7 ± 0,3	7,6 ± 0,2	8,5 ± 0,4	6,3 ± 0,4
Pseudolykorin <sup>56</sup>	7,5 ± 0,4	7,7 ± 0,3	7,9 ± 0,2	7,8 ± 0,3	15,5 ± 1,1	7,5 ± 0,3
Amarbellisin <sup>56</sup>	7,2 ± 0,3	6,7 ± 0,2	8,3 ± 0,3	7,3 ± 0,2	8,3 ± 0,2	6,7 ± 0,3
Haemanthamin <sup>57</sup>	4,5 ± 0,6	6,8 ± 0,7	7,0 ± 0,3	7,7 ± 0,5	8,5 ± 0,2	6,8 ± 0,2
Haemanthidin <sup>57</sup>	4,0 ± 0,4	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2

Další studie dokazuje schopnost inhibice růstu buněk a metastáz u rakoviny prsu *in vitro* i *in vivo*, lykorin inhiboval růst, migraci a stejně tak i indukoval apoptózu. Jeho toxicita byla menší než toxicita paclitaxelu při stejné dávce. Kromě indukce apoptózy se zde uplatnil mechanismus blokování komplexu Src/FAK<sup>58</sup>. Jedná se o komplex intracelulárních nереceptorových tyrosinkináz, které mají antiapoptické vlastnosti a jsou spojeny s nádorovou angiogenezí<sup>59</sup>. Dále byly prokázány protinádorové aktivity *in vivo* u Lewisova plicního karcinomu, *in vitro* na HeLa buňkách (adenokarcinom děložního čípku), CEM (lymfoblastická leukémie), K562 (myeloidní leukémie), MCF-7 (karcinom prsu), KM-3 (lidský mnohočetný myelom) a mnoha dalších nádorových liniích<sup>60</sup>.

Pankratistatinový strukturní typ obsahuje cytotoxicky významné látky a to hlavně pankratistatin a narciklasin. Pankratistatin je schopný selektivně navodit apoptózu v různých lidských nádorových buňkách s tím, že vykazuje nevýznamnou toxicitu na buňky zdravé<sup>61</sup>. Cytotoxicita pankratistatinu byla prokázána na panelu asi 60 buněčných liniích, které zahrnují rakovinné buněčné linie plic, tlustého střeva, vaječníků, ledvin, mozku, myeloidní leukémie a další<sup>18</sup>. Jiné *in vivo* studie dokazují cytotoxický efekt pankratistatinu na modelu metastazující rakoviny prostaty za použití dvou nádorových buněčných linií LNCaP (androgen-citlivá) a DU14 (androgen necitlivá). Látka byla schopna navodit apoptózu u obou linií s tím, že toxický efekt na nenádorové fibroblasty NHF byl nevýznamný. Dále bylo

dokázáno, že pankratistatin selektivně a efektivně indukuje apoptózu spojenou s mitochondriální destabilizací a zvýšením reaktivních kyslíkových radikálů produkovaných v buňkách leukémie, melanomu a hormonálně refraktním karcinomu prsu<sup>61</sup>.

Narciklasin působí protinádorově a antimitoticky – ovlivňuje dělení buňky v metafázi. Inhibuje tvorbu proteinů eukaryotických buněk interakcí s 60S podjednotkou ribozomu, tím snižuje funkci peptidyltransferázy, která umožňuje tvorbu nové peptidové vazby<sup>60</sup>. Působí proti mozgovým nádorům zahrnující gliomy a mozkové metastázy. Narciklasin má schopnost narušit růst a migraci buněk v mikromolárních koncentracích a je až 250krát méně citlivý k normální nenádorovým fibroblastům<sup>4</sup>. Dále vykazuje antileukemické účinky a je aktivní proti řadě nádorových buněk zahrnující například lymfocytární leukémie, karcinom hrtanu nebo karcinom děložního čípku<sup>60</sup>.

Další významné látky z cytotoxického pohledu jsou látky náležící do krininového a haemanthaminového typu (někdy jsou v literatuře uváděny jako  $\alpha$ - a  $\beta$ -krininový typ). Strukturální typy se liší pouze prostorovou orientací 5,10b-ethanového můstku. Slibné protinádorové účinky má haemanthamin, haemanthidin, krinamin (haemanthaminový typ)<sup>60</sup>. U krininového typu se slibně ukazuje alkaloid distichamin<sup>62</sup>.

Stejně jako předtím lykorin byly látky haemanthamin a haemanthidin podrobeny testům na cytotoxickou aktivitu proti následujícím liniím A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL a B16F10 (Tab. 4)<sup>57</sup>. V další studii byla testována antiproliferativní aktivita proti lidským buněčným liniím solidních nádorů A2780 (vaječníku), SW1573 (plic), T-47D (prsu) a WiDr (střeva). Testované látky patřily do různých strukturálních typů a jako nejlepší cytotoxicky působící látky s  $IC_{50} \leq 10 \mu M$  se jevily haemanthamin a haemanthidin (Tab. 5)<sup>63</sup>.

**Tabulka 5:** Cytotoxicita haemanthaminu a haemanthidinu na nádorové linie A2780, SW1573, T-47D a WiDr, vyjádřená  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ]

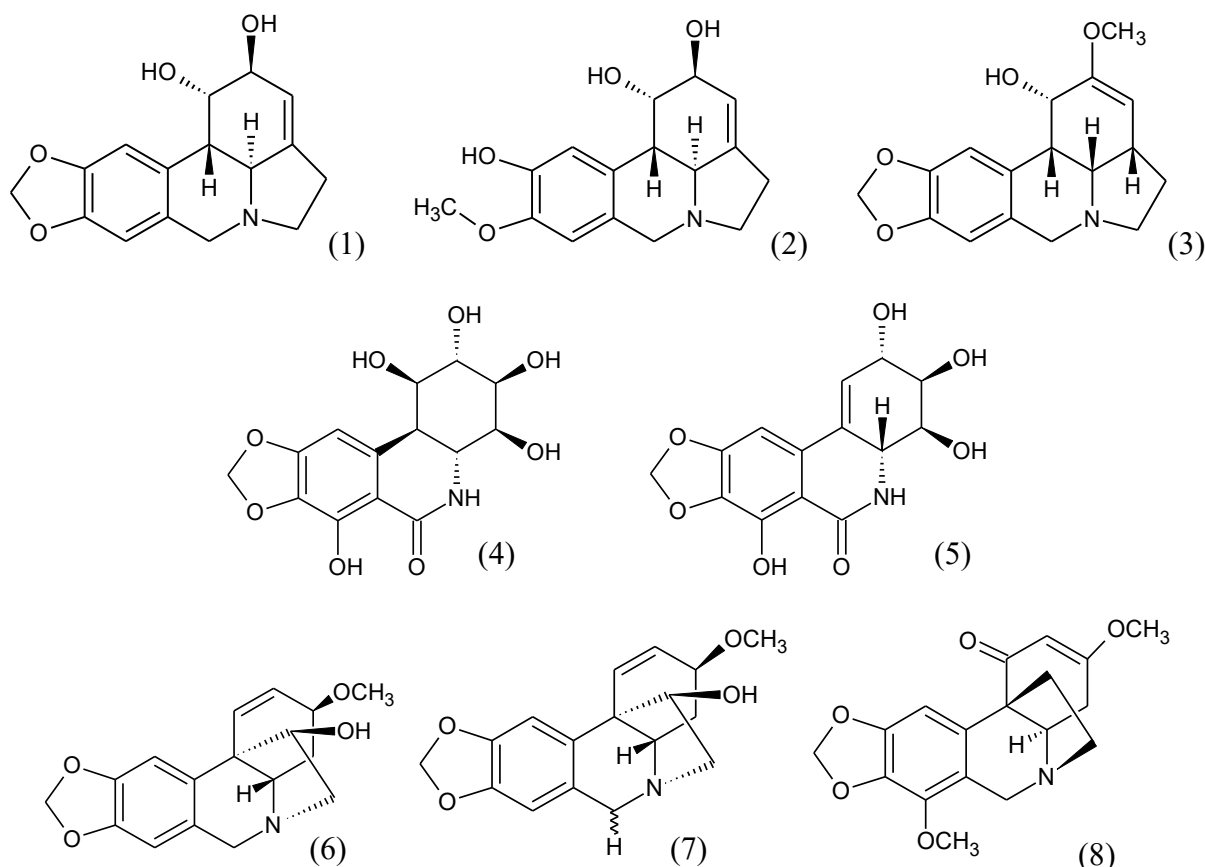
Alkaloid	A2780	SW1573	T-47D	WiDr
Haemanthamin <sup>63</sup>	0,68 ± 0,2	2,1 ± 2,0	0,87 ± 4,0	1,2 ± 6,0
Haemanthidin <sup>63</sup>	1,5 ± 0,1	2,0 ± 1,0	1,8 ± 1,0	2,7 ± 2,0

V následující studii byla hodnocena cytotoxická schopnost třinácti Amaryllidaceae alkaloidů. Použity byly dvě gastrointestinální p53-mutované rakovinné buněčné linie Caco-2 a HT-29 (kolorektální adenokarcinom). Výsledky byly srovnány s působením na nenádorové buňky střevního epitelu FHS-74Int. Jako pozitivní kontrola byl použit vinorelbin. Mezi testovanými látkami byly získány výsledky pro haemanthamin, haemanthidin a lykorin (Tab. 6)<sup>55</sup>.

**Tabulka 6:** Cytotoxicita testovaných látek proti nádorovým (Caco-2, HT-29) a zdravým (FHs-74Int) gastrointestinálním buněným liniím, vyjádřena IC<sub>50</sub> [μM]

Alkaloid	Caco-2	HT-29	FHs-74 Int
Haemanthamin <sup>55</sup>	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Haemanthidin <sup>55</sup>	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,1	11,9 ± 0,9
Lykorin <sup>55</sup>	0,99 ± 0,08	1,2 ± 0,0	22,7 ± 0,1

Alkaloid distichamin náležící do krininového typu byl izolován z rostliny *Boophone disticha*. Jeho výskyt je vzácný a zatím nebyl nalezen v jiné rostlině čeledi Amaryllidaceae. Cytotoxický efekt této látky byl prokázán u následujících rakovinných buněčných linií K562 (chronická myeloidní leukémie), MCF7 (adenokarcinom prsu), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), G-361 (maligní melanom). Bohužel distichamin nemá potřebnou selektivitu a působí cytotoxicky také na buňky zdravé BJ (lidské fibroblasty)<sup>62</sup>.



**Obrázek 18:** Látky s cytotoxickou aktivitou, lykorin (1), pseudolykorin (2), amarbellsin (3), pankratistatin (4), narciklasin (5), haemanthamin (6), haemanthidin (7), distichamin (8)

### 3.2.5 Antimalarická a další antiprotozoální aktivita

Malárie je závažné protozoální onemocnění vyskytující se především v chudých tropických a subtropických oblastech světa. Do Evropy je malárie obvykle zanesena z endemických oblastí hlavně z Afriky a jihovýchodní Asie. Existují čtyři původci malárie – *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, z nichž nejzávažnějším je *P. falciparum* způsobující tropickou malárii. Přenašečem je samička komára rodu *Anopheles*, která vpraví do kůže infekční stadia. Tato stadia jsou krevní cestou zaneseny do jater, kde napadají jaterní buňky a vyvíjejí se (jaterní fáze – bezpříznaková). Po prasknutí hepatocytu se plazmodia uvolňují do krve a napadají erythrocyty (erythrocytální fáze – malárie), v nichž se množí, po zničení erythrocytu namnožená stadia napadají další buňky. Vývoj parazitů je ukončen přeměnou na stádium gametocytu, infekčního stadia pro komára. Příznaky malárie zahrnují střídání horečky a zimnice, pocení, bolesti hlavy a křeče<sup>64</sup>.

Účinnost starších léků se snižuje a proto je potřeba hledat nová antimalarika<sup>65</sup>. Zajímavými alkaloidy této rostlinné čeledi z hlediska antimalarické aktivity jsou lykorin, haemanthamin, haemanthidin a krinamin<sup>66</sup>. Antimalarická aktivita u dvou kmenů – chlorochin-senzitivní T9.96 a chlorochin-rezistentní K<sub>1</sub> byla testována a stanovené hodnoty dokázaly potenciál proti oběma kmenům u látek haemanthaminu, 6-hydroxyhaemanthaminu a lykorinu<sup>65</sup>. Lykorin, augustin a krinamin izolované z cibulí *Crinum amabile* vykázaly také dobrou antimalarickou aktivitu. Ungeremin izolovaný z rostliny *Phaedranassa dubia* kromě aktivity na *P. falciparum* byl aktivní proti prvokům *Trypanosoma brucei rhodesiense* a *Trypanosoma cruzi*<sup>67</sup>, původcům spavé nemoci (*T. brucei*, *T. rhodesiense*) a Chagasovy choroby (*T. cruzi*)<sup>68</sup>. Haemanthamin byl také aktivní proti *T. brucei rhodesiense*<sup>67</sup>.

### 3.2.6 Antivirová aktivita

Další ze zmíněných aktivit je aktivita antivirová, která byla popsána u několika RNA a DNA virů<sup>60</sup>. Lykorin a haemanthamin v *in vitro* studii prokázali antivirové účinky proti viru ptačí chřipky H5N1. Mohli by se stát vhodnými kandidáty při vývoji nových proti-chřipkových léků<sup>69</sup>. Lykorin prokázal antivirové účinky proti viru hepatitidy typu C (HCV) – RNA vir z čeledi *Flaviviridae* – z důvodu jeho cytotoxických vlastností nemůže být v této indikaci používán. Jsou zkoumány lykorinové deriváty, od kterých se očekává zachovaná antivirová schopnost, ale snížená cytotoxicita<sup>70</sup>. V *in vitro* studii trisphaeridin, lykorin, homolykorin a haemanthamin vykazovali vysokou antiretrovirovou aktivitu proti HIV-1 v rozmezí IC<sub>50</sub> = 0,4 – 7,3 µg/mL spolu s nízkým terapeutickým

indexem<sup>71</sup>. Dále lykorin působí proti koronaviru SARS-CoV, který způsobuje těžký akutní respirační syndrom, proti polioviru a herpesviru typu 1. Antivirové účinky byly dále nalezeny u hippeatrinu (proti herpesviru) nebo narciklasinu (proti flaviviru a bunyaviru)<sup>60</sup>.

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Všeobecné postupy

### 4.1.1 Destilace a odpařování

Veškerá používaná rozpouštědla byla předem predestilována. Nejprve byl zachycen destilační předek (cca 5 %) s vodným azeotropem. Následně bylo destilováno zbývající 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v tmavých láhvích.

Odpařování se provádělo pomocí vakuové odparky LABOROTA 4001-efficient, Heidolph, Germany vybavené vodní lázní při 40 °C za sníženého tlaku.

### 4.1.2 Chromatografie

#### 4.1.2.1 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena postupem stupňovité eluce na neutrální  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Směs adsorbentu s rozpouštědlem byla nalita na chromatografickou kolonu obvyklým způsobem. Vzorek byl rozpuštěn v malém množství rozpouštědla a nanesen na povrch sloupce.

#### 4.1.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla provedena vzestupně v předem vysycených skleněných komorách. Doba sycení komor mobilní fází činila 15 – 20 minut pro analytickou TLC a 50 – 60 minut pro preparativní TLC.

## 4.2 Potřeby

### 4.2.1 Rozpouštědla

Cyklohexan, p. a. (Penta), cHx

Diethylamin, p. a. (Penta), DEA

Diethylenoxid, p. a. (Penta),  $\text{Et}_2\text{O}$

Ethanol, p. a. (Penta), EtOH

Ethylacetát, p. a. (Penta), EtOAc

Chloroform, p. a. (Penta),  $\text{CHCl}_3$

Methanol, p. a. (Penta), MeOH

Toluen, p. a. (Penta), To

#### 4.2.2 Chemikálie

Kyselina chlorovodíková 5% (LaChema), HCl

Síran sodný (LaChema), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Uhličitan sodný 10% (LaChema), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### 4.2.3 Detekční činidla

D 1: Dragerdorffovo činidlo

D 2: Mayerovo činidlo

#### 4.2.4 Vytvářecí soustavy pro TLC

S 1: To : DEA 95 : 5

S 2: To : cHx : DEA 50 : 50 : 5

S 3: EtOAc : MeOH : H<sub>2</sub>O 100 : 13 : 10

#### 4.2.5 Chromatografické adsorbenty

A 1: Oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii sušený 12 hod při 200 °C a poté deaktivovaný 6% vody

A 2: Kieselgel 60 F254, Merk; 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC; tloušťka vrstvy 0,2 mm

A 3: Silikagel LS 5/40 UC254; pro preparativní TLC

### 4.3 Izolace

#### 4.3.1 Biologický materiál

Zpracovávaným materiálem byly cibule *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN získané od prodejce Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická identifikace rostlinného materiálu byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a kontrolní vzorky jsou uloženy v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod následujícím označením: CUFPH-16130/AL-447.

#### 4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Celkem byl připraven sumární ethanolický extrakt z cca 34 kg čerstvých cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. 34 kg cibulí bylo nakrájeno, rozemleto a 3×

extrahováno ethanolem (EtOH 96% v/v). Každá část (1,2 kg) se vařila 2× po dobu 30 minut v ethanolu pod zpětným chladičem. Extrakt byl zfiltrován a odpařen za sníženého tlaku pomocí rotační vakuové odparky. Zbytek ethanolu byl odpařen v azeotropní směsi pomocí horké vody. Odparek byl rozpuštěn v 1,5 l 5% kyselině chlorovodíkové. Roztok byl 2× zfiltrován přes vliselín a následně zředěn vodou na 4,5 l o pH 1.

Následně se v dělicí nálevce vytřepalo přibližně 200 ml vodné fáze s diethyletherem, tím došlo k odstranění lipofilních nečistot (2×). Poté byla provedena alkalizace za využití uhličitanu sodného a vytřepání ethylacetátem (3×). Stejným způsobem se vytřepávalo i chloroformem. Ethylacetátové a chloroformové extrakty byly porovnány na TLC a GC/MS, kde vykazovaly shodné spektrum látek. Z tohoto důvodu byl k dalšímu vytřepávání použit chloroform.

V dalším kroku byla vodná fáze převedena do dělicí nálevky, kde proběhlo 2× odtučnění diethyletherem. Byly použity 2 × 4 l diethyletheru (lipofilní nečistoty – horní diethyletherová vrstva). Po odstranění horní vrstvy byla kyselá vodná fáze zalkalizována 10% uhličitanem sodným na pH 10 a byl přidán chloroform (4 × 4 l). Po protřepání a ustanovení rovnováhy byla získána horní organická vrstva (chloroformová vrstva), spodní vodná vrstva byla odpuštěna. Extrakce chloroformem byla provedena 4×, protože i po třetím vytřepání byla reakce s Mayerovým činidlem pozitivní. Po čtvrtém vytřepání extrakt již s Mayerovým činidlem nereagoval. Po odstranění vodné (spodní) fáze a následného odpaření organického rozpouštědla z organické fáze jsme získali 51,5 g primárního alkaloidního extraktu ve formě tmavě hnědého sirupu.

Primární alkaloidní extrakt se znovu podrobil čistícímu procesu. Celkové množství 51,5 g primárního extraktu bylo zředěno na 5% koncentraci rozpuštěním ve 2% kyselině chlorovodíkové na 1 litr. Takto připravený roztok byl zfiltrován přes křemelinu. Křemelina byla následně promyta destilovanou vodou (0,5 l). Tímto bylo získáno 1,5 l vodné fáze. Vodná fáze byla odtučněna diethyletherem (2 × 0,5 l) a alkalizována 10% uhličitanem sodným (460 ml) na pH 10. Dále byla vodná fáze 5× extrahována diethyletherem (5 × 0,5 l) a 8× chloroformem (8 × 0,5 l). Takto získané organické extrakty byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným.

Opakovaným čistícím postupem bylo získáno celkem 31,73 g koncentrovaného alkaloidního extraktu (tmavě hnědý sirup), který byl dále zpracováván pomocí sloupcové chromatografie za účelem izolace alkaloidů v čistém stavu.

### 4.3.3 Sloupcová chromatografie

Adsorbent: 2000 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sušený 12 hodin při 200 °C a následně deaktivovaný 6% vody (2000 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  + 120 ml vody, voda byla postupně přidána po třech částech v průběhu patnácti minut mísení)

Frakce: 250 ml

Mrtvý objem: 1570 ml

Z koncentrovaného alkaloidního extraktu (31,73 g) byl připraven roztěr v poměru 1 : 4 (124 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Extrakt byl rozpuštěn v potřebném množství  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $\text{CHCl}_3$  a postupně adsorbován na stacionární fázi, rozpouštědla byla následně odpařena. Připravený roztěr byl rozdělen pomocí sloupcové chromatografie, při které byla použita mobilní fáze se zvyšující se polaritou (tj. gradientová eluce). Začalo se vyvíjet směsí benzín : chloroform v poměru 70 : 30, polarita se postupně zvyšovala až do poměru 20 : 80 (benzín : chloroform), dále bylo chromatografováno čistým chloroformem, poté chloroformem postupně obohacovaným o ethanol (od 1 : 99 do poměru 50 : 50) a nakonec čistým ethanolem (Tab.7).

Během sloupcové chromatografie bylo získáno 494 frakcí (250 ml každá frakce), na základě analytické TLC byly spojeny do 27 frakcí, které byly následně analyzovány pomocí GC-MS.

**Tabulka 7:** Sloupcová chromatografie, přehled frakcí, použitých mobilních fází a výtěžků

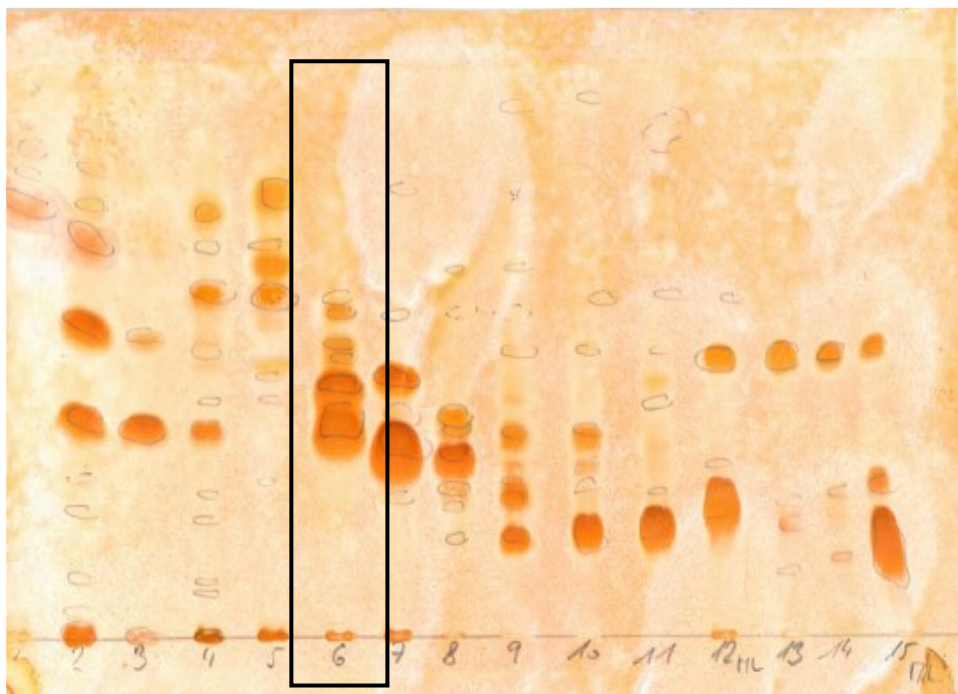
Frakce	Spojené frakce	Mobilní fáze	Množství
	1 – 110	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (70 : 30) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (65 : 35) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (60 : 40) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (55 : 45) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (50 : 50)	Neobsahuje alkaloidy
1	111 – 145	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (45 : 55) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (40 : 60)	10 mg
2	146 – 150	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (40 : 60)	20 mg
3	151 – 158	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (40 : 60)	30 mg
4	159 – 173	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (40 : 60)	70 mg
5	174 – 177	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (40 : 60)	50 mg
6	178 – 187	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (35 : 65)	1,59 g
7	188 – 191	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (35 : 65)	1,69 g
8	192 – 195	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (35 : 65)	300 mg
9	196 – 199	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (35 : 65)	80 mg
10	200 – 215	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (35 : 65) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (30 : 70)	370 mg
11	216 – 221	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (30 : 70)	170 mg
12	222 – 297	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (30 : 70) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (25 : 75) Benzín : CHCl <sub>3</sub> (20 : 80)	3,16 g
13	298 – 324	Benzín : CHCl <sub>3</sub> (20 : 80) CHCl <sub>3</sub> (100) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	310 mg
14	325 – 329	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	183 mg
15	330 – 332	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	828 mg
16	333 – 336	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	616 mg
17	337 – 357	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	1,20 g
18	358 – 373	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2)	1,43 g
19	374 – 381	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2)	1,39 g
20	382 – 386	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2)	1,13g
21	387 – 397	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2)	585 mg
22	398 – 402	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95 : 5)	127 mg
23	403 – 408	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95 : 5)	182 mg
24	409 – 429	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95 : 5) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90 : 10)	936 mg
25	430 – 466	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90 : 10) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (80 : 20)	6,54 g
26	467 – 478	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (80 : 20) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (50 : 50)	672 mg
27	479 – 493	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (50 : 50) EtOH (100)	941 mg
Celkem			24, 52 g

#### 4.3.4 Kontrolní tenkovrstvá chromatografie

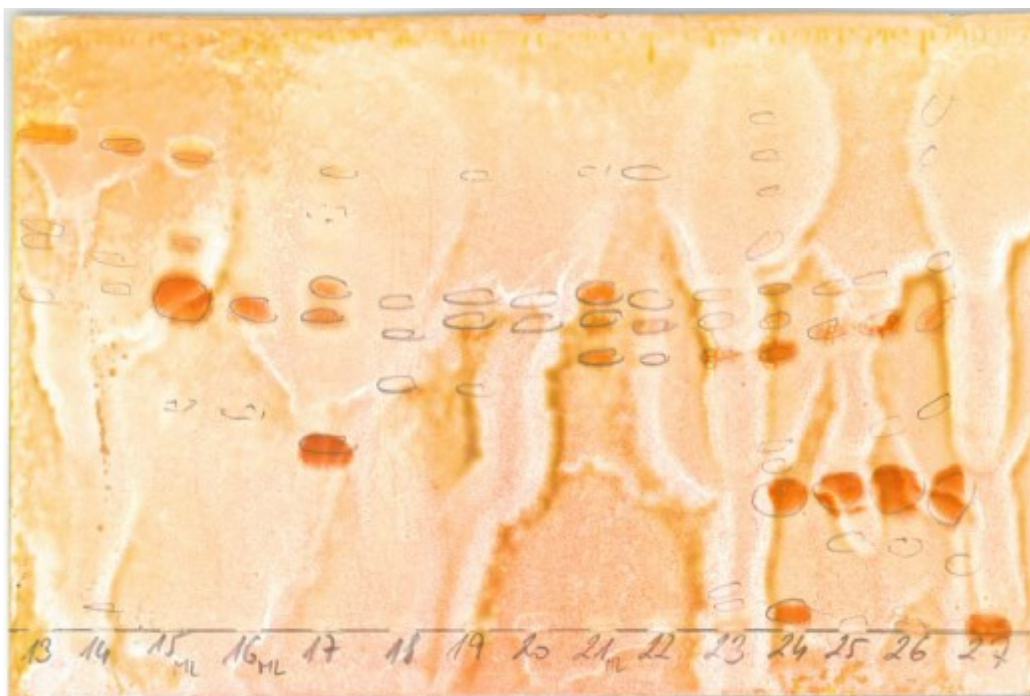
Při vyvíjení kontrolních TLC bylo použito 6 různých vyvíjecích soustav s rostoucí polaritou (Tab. 8). Po odpaření rozpouštědel a vysušení byla provedena souhrnná tenkovrstvá chromatografie, následně byla pro frakce 1 – 15 zvolena vyvíjecí soustava To : EtOAc : DEA 7 : 2 : 1 (Obr. 19) a pro frakce 16 – 27 vyvíjecí soustava EtOAc : MeOH : DEA 5 : 4 : 1 (Obr. 20).

**Tabulka 8:** Přehled použitých mobilních fází

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



**Obrázek 19:** Souhrnná TLC spojených frakcí 1 – 15 získaných z alkaloidního extraktu *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN (adsorbent A2, To : EtOAc : DEA 7 : 2 : 1, komora nasycená, vyvíjeno 2×, detekce Dragendorfovo činidlo)

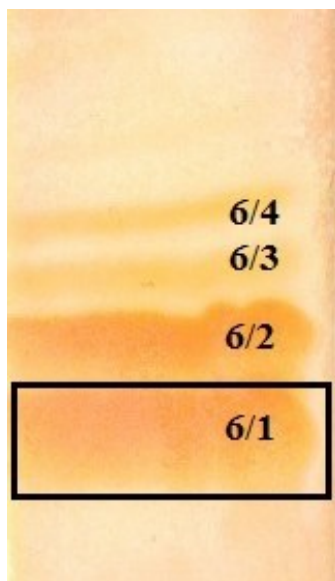


**Obrázek 20:** Souhrnná TLC spojených frakcí 13 – 27 získaných z alkaloidního extraktu *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN (adsorbent A2, EtOAc : MeOH : DEA 5 : 4 : 1, komora nasycená, vyvíjeno 2×, detekce Dragendorfovo činidlo)

#### 4.3.5 Zpracování frakce 6

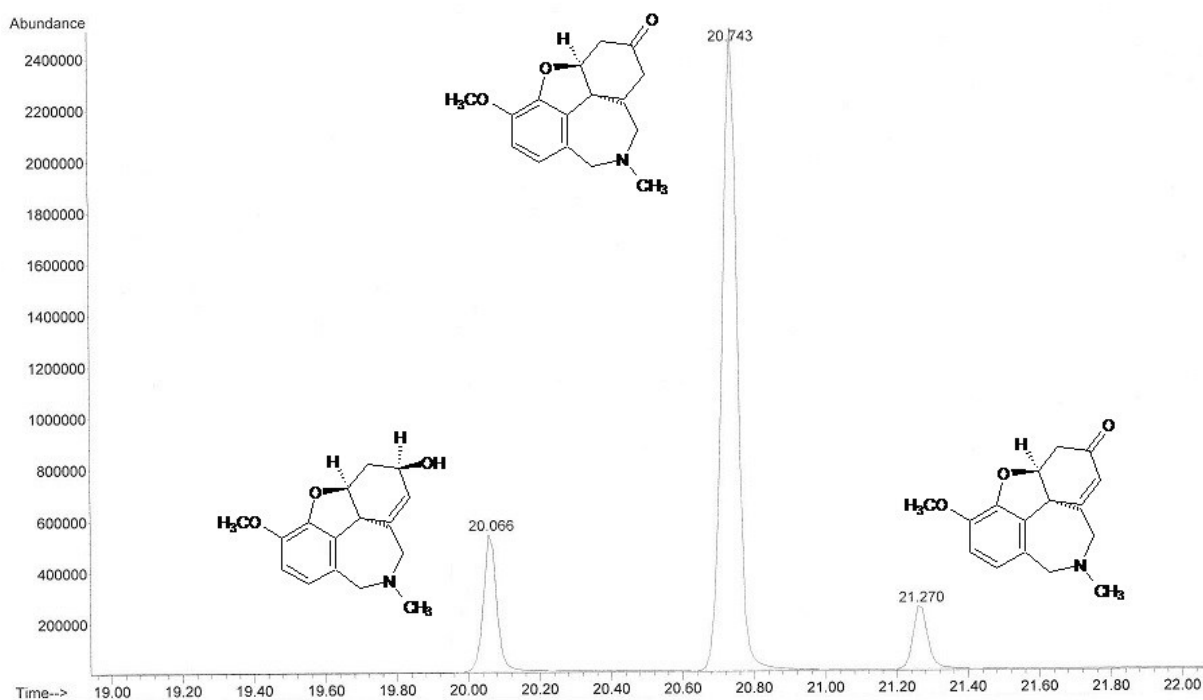
V rámci této diplomové práce byla vybrána a dále zpracovávána frakce číslo 6, která je zvýrazněna v souhrnné TLC frakcí 1 – 15 (Obr. 19).

Vzorek o hmotnosti 1,59 g byl rozpuštěn v chloroformu a následně byl získán žlutooranžový roztok. Preparativní TLC byla provedena na 31 skleněných deskách za použití adsorbentu A3. Chromatografické desky byly vyvíjeny vždy 3× v soustavě S1, která byla předem stanovena analytickou TLC za použití adsorbentu A2. Na základě detekce pod UV lampou a postříkáním detekčním činidlem byly na deskách pozorované 4 zóny označeny jako podfrakce 6/1, 6/2, 6/3, 6/4, zóny jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 21).



**Obrázek 21:** Preparativní TLC znázorňující jednotlivé podfrakce frakce 6 s vyznačenou podfrakcí 6/1, vybrána pro vlastní identifikaci alkaloidů

Všechny zóny byly postupně přečištěny následujícím postupem. Zóny byly společně s SiO<sub>2</sub> vyškrábnuty, nanесeny na kolonu a následně byla směs promyta směsí EtOH a CHCl<sub>3</sub> v poměru 1 : 1. Koncentrované vzorky jednotlivých zón frakce 6, tj. podfrakce 6/1, 6/2, 6/3 a 6/4 byly následně podrobeny strukturní analýze GC-MS, na jejímž základě byly identifikovány (Obr. 22, Tab. 9).



**Obrázek 22:** GC-MS analýza podfrakce 6/1, galantamin (RT = 20.066), lykoraminon (RT = 20.743), narwedín (RT = 21.270)

**Tabulka 9:** Přehled obsahových látek ve frakci 6 zjištěných na základě GC-MS analýzy

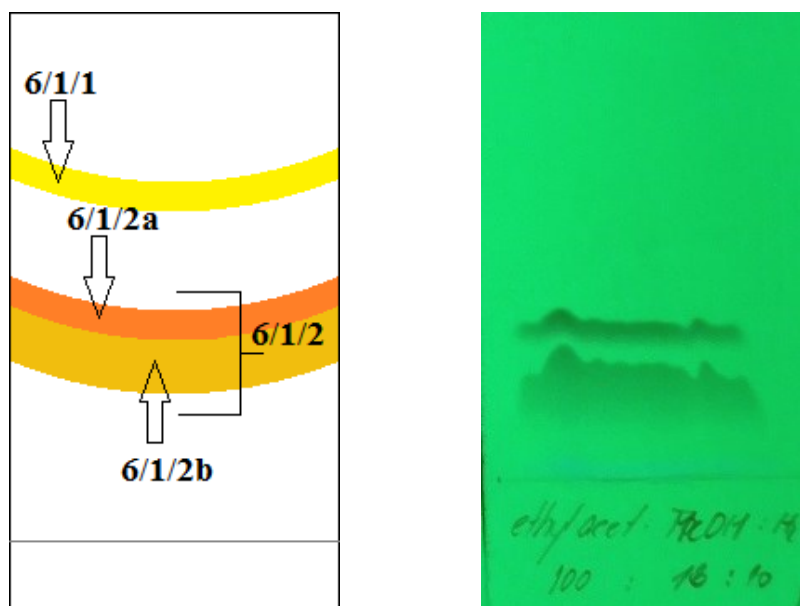
<b>Podfrakce</b>	<b>Hmotnost (g)</b>	<b>Obsahové látky</b>
6/1	0,5086	galantamin, lykoraminon, narwedín
6/2	0,3683	galantamin
6/3	0,2465	karanin, galantamin, lykoraminon, narwedín, pluviin
6/4	0,0713	nealkaloidní

#### 4.3.6 Zpracování podfrakce 6/1

V rámci mé diplomové práce byla dále zpracovávána podfrakce 6/1 obsahující směs galantaminu, lykoraminonu a narwedínu.

Vzorek o hmotnosti 0,5086 g byl rozpuštěn v chloroformu, postupně nanesen na 12 chromatografických desek a následně podroben TLC za použití adsorbentu A3. Vyvíjení se provádělo vždy 5× v soustavě S1. Na základě detekce pod UV lampou byly rozlišeny 2 zóny, horní zóna označena jako 6/1/1 s obsahem čistého galantaminu a dolní zóna označena jako 6/1/2 obsahující směs narwedínu a lykoraminonu (Obr. 23). Nejprve byla vyškrábnuta a zpracovávána, podle výše popsaného postupu, horní zóna (6/1/1), která byla následně krystalizována ze směsi  $\text{CHCl}_3$  : EtOH v poměru 1 : 1. Tímto způsobem bylo získáno 20 mg bílých krystalků označených jako 6/1-1. Látka byla na základě NMR a MS analýzy identifikována jako galantamin, který byl již dříve izolován na našem pracovišti.

Dále byla zpracovávána dolní zóna (6/1/2) obsahující směs dvou látek, jejichž struktury se liší pouze v jedné dvojné vazbě. Z tohoto důvodu bylo zkoušeno více vyvíjecích soustav, ze kterých se nejvýhodněji jevila soustava S3. V horní části této vrstvy označené 6/1/2a byl předpokládán narwedín, který pod UV lampou tvořil nejtmaší část a ve spodní části označené 6/1/2b lykoraminon tvořící světlejší část. Po úspěšném separování směsi soustavou S3 byly látky přečištěny (výše popsaným způsobem) a krystalizovány ze směsi  $\text{CHCl}_3$  : EtOH v poměru 1 : 1. Tímto způsobem byly v obou případech získány oranžové krystalky označené jako 6/1-2a (15 mg) a 6/1-2b (30 mg), které byly na základě NMR a MS analýz identifikovány jako narwedín (6/1-2a) a lykoraminon (6/1-2b).



**Obrázek 23:** TLC podfrakce 6/1 s vyznačenými zónami (nalevo), TLC rozdělující zónu 6/1/2 na 6/2/1a - horní a 6/2/1b - dolní zónu, vyvíjecí soustava ethylacetát, methanol, voda 100 : 13 : 10

## 4.4 Určení struktury izolovaných látek

### 4.4.1 GC/MS analýza

GC/MS analýza izolovaných alkaloidů byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 pracující s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV za použití kolony Hp-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA) a teplotního programu 100 °C – 180 °C (25 min), 180 °C (1 min), 180 – 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1 μl methanolickeho roztoku sumárního extraktu (1 mg/μl) při splitu 1 : 10.

Alkaloidy byly identifikovány porovnáním jejich spekter se spektry dostupné v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) s daty publikovanými v literatuře a se standardy látek již izolovaných na našem pracovišti.

### 4.4.2 NMR analýzy

NMR spektra byla měřena pomocí spektrofotometru VNMR S500 NMR pracující o frekvenci 500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . Chemické posuny byly zaznamenány jako  $\delta$  hodnoty v pars per milion (ppm) a jsou vztaženy k vnitřnímu standardu, kterým byl tetramethylsilan; 7,26 ppm, v  $^1\text{H}$  spektru nebo k signálu solventu 77,0 ppm v  $^{13}\text{C}$  spektrech.

## 4.5 Testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů

### Příprava hemolyzátu a plazmy

Jako zdroj acetylcholinesterasy (HuAChE) je použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterasy (HuBuChE) je lidská plazma.

Erytrocyty se získají z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru se krev rozdělí stejněměrně po 5 ml do šroubovacích zkumavek a provede se centrifugace při rychlosti 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Po první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nebyly erytrocyty, a uchovává se do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin).

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu se opatrně odsaje bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička je sestřižena, odečte se objem erytrocytární masy a tento sediment se zředí takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby byl objem suspenze 13 ml. Obsah se dobře promíchá a provede se centrifugace stejným způsobem, jak je uvedeno výše při oddělování plazmy. Promytí tímto způsobem se provede celkem 3× a promývací kapalina se dokonale odstraní. Po tomto promytí se přidá takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erytrocyty : pufr 1 + 8 – 9, směs se opět homogenizuje, přelije do Erlenmayerovy baňky a erytrocyty se ponechají spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se u suspenze stanoví acetylcholinesterasová aktivita, případně se 5mM fosfátovým pufrům upraví absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08 – 0,15) a naředěný hemolyzát se uchovává do doby použití při -22 °C.

Butyrylcholinesterasová aktivita plazmy se stanoví stejným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15 – 0,20), uchovává se stejným způsobem jako hemolyzát.

### Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  se použije Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)<sup>1</sup> [ $\lambda = 436$  nm (AChE), nebo  $\lambda = 412$  nm (BuChE)]. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky jsou

porovnány s hodnotami IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesteras: galantaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

$$\% I = 100 - (100 \times \Delta A_{BI} / \Delta A_{Sa})$$

% I – procento inhibice;  $\Delta A_{BI}$  – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min;  $\Delta A_{Sa}$  – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

### **Stanovení aktivity enzymů**

Do 6 jamek mikrotitračních destiček se napipetuje 8,3  $\mu$ l plazmy nebo hemolyzátu, přidá se 283  $\mu$ l 5 mM DTNB, 8,3  $\mu$ l DMSO, po 1minutovém promíchání na mikrotřepače se směs inkubuje v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom se přidá 33,3  $\mu$ l roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10 mM butyrylthio-cholinjodidu) a zjistí se při příslušné vlnové délce absorbance (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm). Obvyklým způsobem se vypočte rozdíl a stanoví průměr se směrodatnou odchylkou.

### **Stanovení aktivity látek**

Použijí se stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), stejný postup měření, a použijí se koncentrace látky: 40 mM, 10, 4, 1, 0,4, případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady se pipetuje DMSO jako slepý vzorek.

Získaná inhibiční aktivita IC<sub>50</sub> HuAChE a IC<sub>50</sub> HuBuChE pro jednotlivé látky byla porovnávána s inhibičními aktivitami referenčních látek – galantaminem (IC<sub>50,HuAChE</sub> = 1,710  $\pm$  0,065  $\mu$ M, IC<sub>50,HuBuChE</sub> = 42,301  $\pm$  0,065  $\mu$ M), huperzinem A (IC<sub>50,HuAChE</sub> = 0,033  $\pm$  0,001  $\mu$ M, IC<sub>50,HuBuChE</sub> > 1000  $\mu$ M) a berberinem (IC<sub>50,HuAChE</sub> = 0,705  $\pm$  0,104  $\mu$ M, IC<sub>50,HuBuChE</sub> = 30,721  $\pm$  3,492  $\mu$ M).

### **Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyl oligopeptidase**

POP byla rozpuštěna v pufovaném fyziologickém roztoku PBS, specifická aktivita enzymu byla 0,2 U·ml<sup>-1</sup>. Testování aktivit bylo provedeno na polystyrenové mikrotitrační destičce s rovným a průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny jejich rozpuštěním v DMSO (10 mM). Roztoky pro testování (10<sup>-3</sup> – 10<sup>-7</sup> M) byly připraveny ředěním zásobních roztoků superčistou vodou, slepé vzorky byly použity o stejné koncentraci DMSO. Jako substrát pro testování inhibiční aktivity byl použit Z-Gly-Pro-p-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno

170  $\mu$ l PBS, 5  $\mu$ l roztoku testované látky o určité koncentraci a 5  $\mu$ l roztoku POP, následně došlo k inkubaci po dobu 5 min při teplotě 37°C. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno do každé jamky 20  $\mu$ l substrátu a směs byla znovu inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37°C. Sleduje se vznik p-nitroanilinu, který je přímo úměrný aktivitě POP, a je měřen spektrofotometricky při  $\lambda = 405$  nm na microplate ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC<sub>50</sub>. Získané inhibiční aktivity testovaných látek byly porovnány s hodnotami IC<sub>50</sub> referenčních látek berberinu (IC<sub>50</sub> = 142,3  $\pm$  21,1  $\mu$ M) a Z-Pro-prolinalu (IC<sub>50</sub> = 3,269  $\pm$  0,021 mM).

### **Stanovení cytotoxicity, antimikrobiální a antifungální aktivity**

Všechny studie týkající se cytotoxicity izolovaných látek byly provedeny ve spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze, s katedrou biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice a ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě v Hradci Králové. Podrobný soupis použitých chemikálií a vysvětlení postupů je možné nalézt v následujících publikacích Doskočil et al. (2015)<sup>55</sup> Havelek et al. (2014)<sup>72</sup>.

Antimikrobiální a antifungální aktivita vybraných alkaloidů byla testována ve spolupráci s katedrou kvality zemědělských produktů na České zemědělské univerzitě v Praze. Podrobný popis experimentů je možné nalézt v následující literatuře Opletal et al. (2014)<sup>73</sup> a Ločárek et al. (2015)<sup>74</sup>.

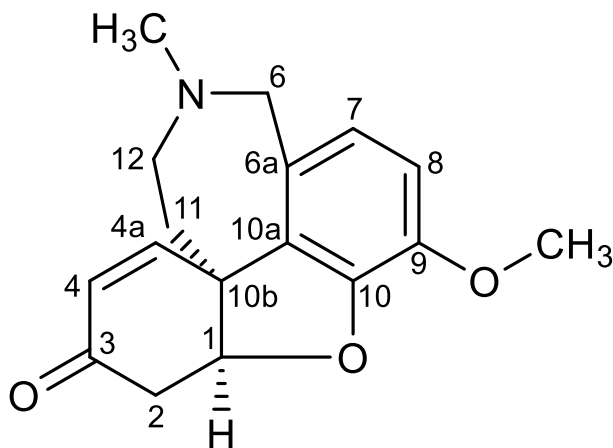
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Strukturní analýza izolovaných látek

#### 5.1.1 Narwedín

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galantaminového typu narwedín<sup>75</sup>.

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{19}NO_3$



Obrázek 24: Narwedín

#### MS analýza

EIMS  $m/z$  (%): 285( $M^+$ , 84), 284(100), 242(18), 216(20), 199(18), 174(31)

#### NMR analýza

##### $^1H$ NMR (500 MHz, $\delta$ , $CDCl_3$ , 25 °C)

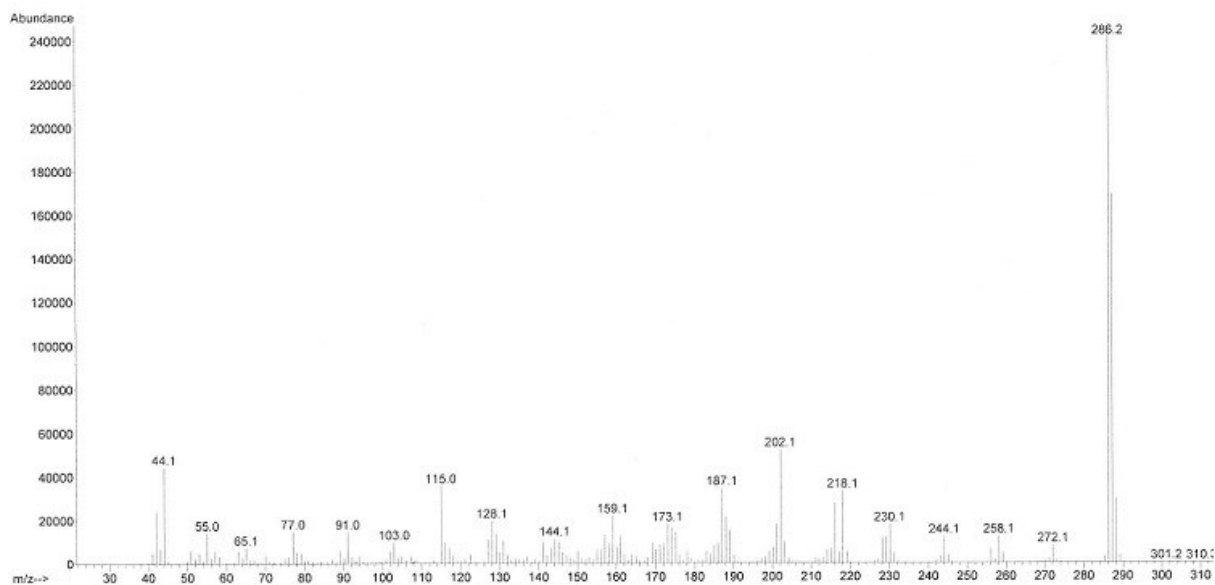
6,9 (1H, d,  $J = 10,4$  Hz, H-6), 6,7 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-8), 6,6 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-7), 6,0 (1H, d,  $J = 10,4$  Hz, H-4), 4,7 (1H, m, H-1), 4,1 (1H, d,  $J = 10,3$  Hz, H-6a), 3,8 (3H, s, OMe), 3,8 (1H, d,  $J = 14,9$  Hz, H-6), 3,3 (1H, t, H-12), 3,1 (2H, m, H-2, H-12), 2,7 (1H, dd,  $J = 13,9$  Hz,  $J = 2,5$  Hz, H-2), 2,5 (3H, s, NMe), 2,3 (1H, dt, H-11), 1,9 (1H, d,  $J = 13,8$  Hz, H-11).

##### $^{13}C$ NMR (125 MHz, $\delta$ , $CDCl_3$ , 25 °C)

194,4; 147,0; 144,3; 144,0; 130,5; 129,4; 127,1; 122,0; 111,8; 88,0; 60,7; 56,0; 54,1; 49,0; 42,4; 37,3; 33,2.

## Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -39,3^\circ \quad (c = 0,22; \text{CHCl}_3)$$

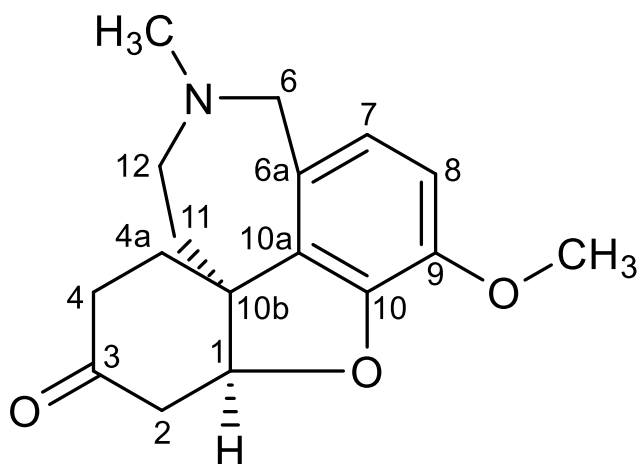


Obrázek 25: EI-MS spektrum narwedinu

### 5.1.2 Lykoraminon

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galantaminového typu lykoraminon<sup>76</sup>.

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



Obrázek 26: Lykoraminon

## MS analýza

EIMS  $m/z$  (%): 287( $M^+$ , 85), 286 (100), 272 (2), 258 (3), 244 (5), 230 (8), 218 (19), 202 (34), 187 (17)

## NMR analýza

### $^1\text{H}$ NMR (500 MHz, $\delta$ , $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)

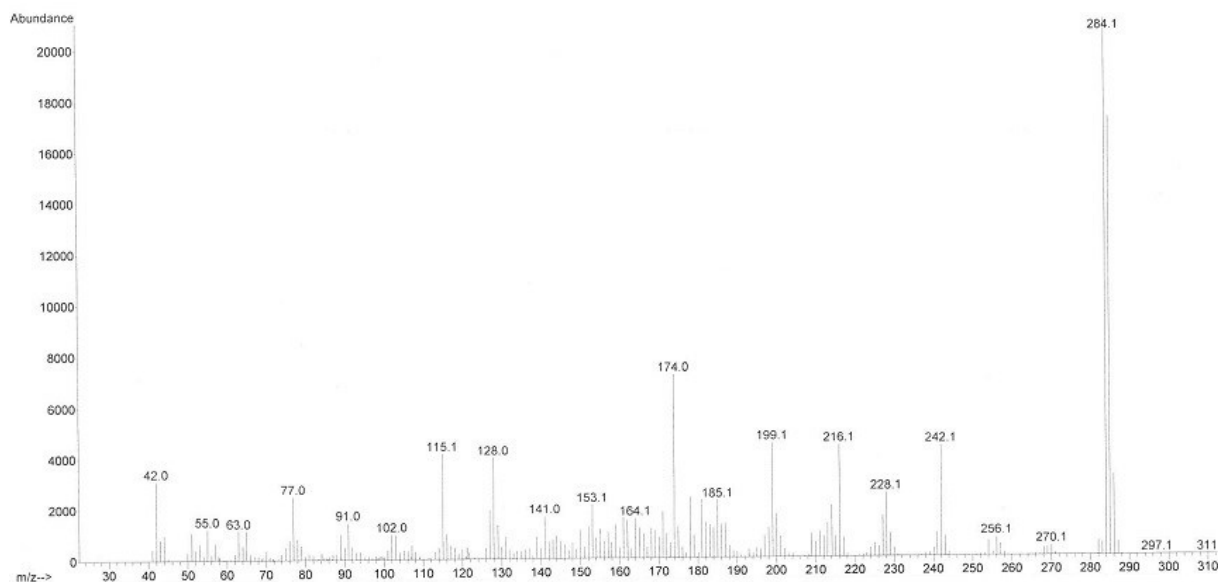
6,69 (1H, d,  $J = 10,4$  Hz, H-4a), 6,66 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-8), 4,78 (1H, d,  $J = 7,3$  Hz, H-7), 4,16 (1H, d,  $J = 10,4$  Hz, H-4), 3,85 (1H, M, H-1), 3,70 (1H, d,  $J = 10,3$  Hz, H-6a), 3,28 (3H, s, OMe), 3,15 (1H, d,  $J = 14,9$  Hz, H-6), 3,02 (1H, t, H-12), 2,98 (2H, m, H-2, H-12), 2,75 (1H, dd,  $J = 13,9$  Hz,  $J = 2,5$  Hz, H-2), 2,32 (3H, s, NMe), 2,09 (1H, dt, H-11), 1,66 (1H, d,  $J = 13,8$  Hz, H-11).

### $^{13}\text{C}$ NMR (125 MHz, $\delta$ , $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)

208,8; 146,7; 143,7; 131,7; 129,0; 122,3; 111,0; 88,3; 59,8; 55,9; 54,0; 47,5; 41,9; 40,1; 36,2; 35,6.

## Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -27,3^\circ$  ( $c = 0,22$ ;  $\text{CHCl}_3$ )



Obrázek 27: EI-MS spektrum lykoraminonu

## 5.2 Biologická aktivita izolovaných látek

Obě sloučeniny byly izolovány v množství, které umožňovalo strukturní analýzu látek a provedení několika biologických testů. Látky byly testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám, na inhibiční aktivitu vůči POP a v rámci spolupráce s dalšími pracovišti byla testována aktivita protinádorová a antimalarická (jaterní stádium *Plasmodium berghei*). V následujících tabulkách jsou shrnuty výsledky provedených studií.

**Tabulka 10:** Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vyjádřená jako IC<sub>50</sub> – inhibice HuAChE, HuBuChE, POP

Látka	HuAChE [ $\mu$ M]	HuBuChE [ $\mu$ M]	POP [mM]
Lykoraminon	143,8 $\pm$ 8	> 1000	bude měřeno
Narwedín	281 $\pm$ 33	911 $\pm$ 68	945 $\pm$ 115
Galantamin <sup>a</sup>	1,71 $\pm$ 0,07	42,3 $\pm$ 0,07	> 1000
Huperzin A <sup>a</sup>	0,033 $\pm$ 0,001	> 1000	> 1000
Berberin <sup>a,b</sup>	0,71 $\pm$ 0,10	30,7 $\pm$ 3,50	0,14 $\pm$ 0,02
Z-Pro-prolinal <sup>b</sup>	NT	NT	3,27 $\pm$ 0,02

NT – netestováno, a – standard pro měření HuAChE, HuBuChE, b – standad pro měření POP

**Tabulka 11:** Výsledky protinádorové aktivity izolovaných látek proti buňkám kolorektálního karcinomu, vyjádřené jako IC<sub>50</sub>

Látka	Nádorové buňky		Zdravé buňky
	HT-29 [ $\mu$ M]	Caco-2 [ $\mu$ M]	FHs-74 Int [ $\mu$ M]
Lykoraminon	> 1000	> 1000	bude měřeno
Narwedín	> 1000	> 1000	bude měřeno
Vinorelbin <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01	NT	4,00 $\pm$ 0,30

a – standard

## 6 DISKUZE A ZÁVĚR

U alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo popsáno velké množství zajímavých biologických aktivit. Jmenovitě se jedná o inhibici acetylcholinesterázy, která je prakticky využívána v terapii Alzheimerovy choroby, protinádorovou, antimalarickou, antibakteriální, antivirovou, antimykotickou a analgetickou aktivitu<sup>3,4</sup>.

Na základě rozsáhlého screeningu asi 80 kultivarů rostlin rodu *Narcissus* byla pro fytochemickou studii vybrána rostlina *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. Cílem této diplomové práce byla příprava sumárního alkaloidního extraktu, který byl následně podroben sloupcové chromatografii se snahou prokázat a izolovat alkaloidy v čistém stavu a následně zjistit jejich biologické aktivity. Pro vlastní izolaci alkaloidů byla vybrána frakce číslo 6 (1,56 g), která byla zpracována společně s kolegyní E. Kohelovou. Před samotným zpracováním byl vzorek podroben GC/MS analýze, která ukázala přítomnost alkaloidů různých strukturních typů, přičemž většina alkaloidů této frakce nebyla v době zpracování na našem pracovišti izolována. Za využití opakované preparativní TLC byla frakce číslo 6 separována na 4 podfrakce a v rámci méj diplomové práce byla dále vybrána podfrakce 6/1. Opakovaná preparativní TLC a krystalizace vedla k izolaci dvou alkaloidů v čistém stavu. Izolované látky byly na základě MS, NMR analýzy a optické otáčivosti identifikovány jako narwedín a lykoraminon.

Na základě GS-MS analýzy byl dříve narwedín prokázán v alkaloidních extraktech rostlin rodu *Narcissus* (*N. poeticus* cv. Pink Parasol<sup>77</sup>, *N. cv. Virginia Sunrise*<sup>16</sup>, *N. pseudonarcissus* cv. Cardila, *N. cv. Katie Heath*, *N. cv. Jack Snipe*<sup>78</sup>), *Galanthus* (*G. nivalis*, *G. elwesii*, *G. woronowii*<sup>16</sup>), *Leucojum* (*L. aestivum*<sup>16</sup>), *Zephyranthes* (*Z. concolor*<sup>79</sup>), *Lycoris* (*L. aurea*, *L. radiata*, *L. quanxiensis*<sup>80</sup>) a dalších. Narwedín je relativně častý alkaloid, který se v Amaryllidaceae rostlinách nachází v nižších koncentracích. Izolace proběhla z různých druhů rostlin rodu *Hippeastrum* (*H. aulicum*, *H. calyptatum*<sup>81</sup>), dále z cibulí *Galanthus woronowii*<sup>82</sup> a *Crinum asiaticum*<sup>83</sup>.

Lykoraminon byl prozatím identifikován pouze prostřednictvím GC/MS analýzy v rodě *Narcissus* v jediném druhu *N. joquilla* L.<sup>84</sup>. V literatuře je dostupný popis NMR spektra a to z důvodu snahy o polosyntetickou přípravu této látky z galanthaminu<sup>85</sup>. V rámci této diplomové práce byl lykoraminon izolován z přírodního materiálu poprvé.

Izolované látky náleží do galantaminového strukturního typu a liší se od sebe pouze přítomností dvojně vazby v poloze C4, C4a. Obě sloučeniny jsou strukturně blízké

galantaminu, Amaryllidaceae alkaloidu, který je využíván v terapii AD. Rozdíl je vázán na polohu C3, kde ve struktuře galantaminu nalezneme hydroxylovou skupinu a u látek izolovaných skupinu karbonylovou. Obecně galantaminový strukturní typ vykazuje nejvýznamnější inhibiční aktivitu vůči AChE, proto se předpokládalo, že by i zde mohla být nalezena zajímavá aktivita. Bohužel po podrobení izolovaných alkaloidů na test inhibiční aktivity vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE látky zajímavou aktivitu neukázaly. Stejně tomu bylo u testu na inhibici vůči POP u narwedinu, výsledky lykoraminonu na inhibici vůči POP jsou ve fázi měření. Dále byly látky testovány ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou v Praze na protinádorovou aktivitu proti dvěma p-53 negativním nádorovým buněčným liniím kolorektálního karcinomu Caco-2, HT-29, ani zde nebyla nalezena zajímavá aktivita. V rámci testů na protinádorovou aktivitu bude v nejbližší době studována i cytotoxicita k buňkám zdravým, která zatím nemohla být uskutečněna v důsledku problému s kultivací buněk. Ve spolupráci s univerzitou v Lisabonu byla studována antimalarická aktivita na jaterní stádium prvoka *Plasmodium berghei*. Výsledky byly opět negativní. V blízké době se ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou v Praze uskuteční studie týkající se antimikrobiální a antifungální aktivity izolovaných látek.

V současné době lze konstatovat, že izolované látky narwedin a lykoraminon jsou z pohledu biologické aktivity relativně nezajímavé.

## 7 LITERATURA

1. Jahodář L.: *Farmakobotanika: Semenné rostliny*, str. 9-11, 181. Karolinum, Praha 2011.
2. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*, str. 193-196, 214-215. Karolinum, Praha 2016.
3. Jin Z.: Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1318 (2016).
4. He M., Qu C., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv.* 5, 16562 (2015).
5. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 19, 342 (2009).
6. Dallwitz M. J., Watson L.: The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. *DELTA: DEscription Language for TAXonomy* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/angio/images/ebot1507.jpg>
7. Dallwitz M. J., Watson L.: The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. *DELTA: DEscription Language for TAXonomy* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/angio/images/bmag46.jpg>
8. Dallwitz M. J., Watson L.: The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. *DELTA: DEscription Language for TAXonomy* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/angio/images/ebot1501.jpg>
9. *Missouri Botanical Garden* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=251151&isprofile=0&>

10. Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudencio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L.: Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Aral. J. Chem.* zasláno do tisku (2017).
11. Banerji B. K., Batra A., Saxena M., Dwivedi A. K.: *Narcissus* – a fragrant bulbous plant. *Herbertia* 64, 328 (2010).
12. Vaněk V., Ondrušková L., Petrová E., Václavík J.: *Tulipány, narcisy, hyacinty*, str. 120. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1974.
13. *Daffodil Divisions Using the RHS System of Classification* [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://daffodilusa.org/daffodil-info/daffodil-divisions-cultivars/>
14. Krésová K.: *Bakalářská práce*. Charakteristika a možnosti použití rodu *Narcissus* L. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici, Lednice 2009.
15. *Missouri Botanical Garden* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://www.missouriherbarium.org/PlantFinder/FullImageDisplay.aspx?documentid=7412>
16. Breiterová K.: *Diplomová práce*. Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů jednoděložných alkaloidních rostlin.VIII. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.
17. Takos A. M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *J. Mol. Sci.* 14, 11713 (2013).
18. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* 107, 701 (2013).
19. Cahlíková L.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2013.

20. Konrath E. L., Passos C. D. S., Klein-Junior L. C., Henriques A. T.: Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1701 (2013).
21. Vlček J.: *Klinická farmacie I.*, str. 276-289. Grada, Praha 2010.
22. Jiráček R.: *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*, str. 11-33. Grada, Praha 2009.
23. Pidrman V.: *Demence*, str. 13-15. Grada, Praha 2007.
24. Preiss M., Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii*, str. 123-132. Grada, Praha 2006.
25. Fišar Z.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie: 2., přepracované a doplněné vydání*, str. 299-310. Grada, Praha 2009.
26. Holmerová I., Baumanová M., Jurašková B., Vaňková H., Jiráček R.: Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí. *Remedia* 24, 474 (2014).
27. Metzdorff M. T.: Evidence-based medicine: What it is, what it isn't, and are we practicing it?. *J. Trauma Acute Care Surg.* 75, 927 (2013).
28. Dušek K., Večeřová-Procházková A.: *Diagnostika a terapie duševních poruch: 2., přepracované vydání*, str. 471-479. Grada, Praha 2015.
29. Sheardová K., Hort J., Rusina R., Bartoš A., Líněk V., Rössner P., Rektorová I.: Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 70, 589 (2007).
30. Korábecký J., Špiclovská K., Benek O., Musílek K., Soukup O., Kuča K.: Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Čes. Slov. Farm.* 61, 210 (2012).
31. Doležal M.: *Farmaceutická chemie léčiv působící na centrální nervový systém*, str. 91-93. Karolinum, Praha 2013.
32. Colovic M. B., Krstić D. Z., Lazarević-Pasti T. D., Bondžić A. M., Vasić V. M.: Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 315 (2013).

33. Harvey A. L.: The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmac. Ther.* 68, 113 (1995).
34. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Voj. Zdrav. Listy* 72, 37 (2003).
35. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lékáren.* 7, 39 (2011).
36. Lopez S., Batista J., Viladomat F., Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* 71, 2521 (2002).
37. Jiráček R.: Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Čes. Slov. Psych.* 111, 127 (2015).
38. Drtinová L., Pohanka M.: Možnosti využití Huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chem. Listy* 107, 12 (2013).
39. Christensen D. D.: Changing the course of Alzheimer's disease: Anti-amyloid disease-modifying treatments on the horizon. *J. Clin. Psych.* 9, 32 (2007).
40. Vališ M., Kalmucká D.: Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurol. praxi* 12, 33 (2011).
41. Novakovic D., Feligioni M., Scaccianoce S., Caruso A., Poccinini S.: Profile of gantenerumab and its potential in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 569 (2014).
42. Cummings J., Cho W., Ward M., Friesenhahn M., Brunstein F., Honigberg L.: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study to evaluate the efficacy and safety of crenezumab in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *J. Alz. Assoc.* 10, 275 (2014).
43. Doody R. S., Thomas R.G., Farlow M., Iwatsubo T., Vellas B., Joffe S., Kieburtz K., Raman R., Sun X., Aisen P. S.: Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 311 (2014).
44. Lemere C. A., Masliah E.: Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- $\beta$  immunotherapy?. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 108 (2010).

45. Santa-Maria I., Hernández F., Del Rio J., Moreno F. J., Avila J.: Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Mol. Neurodegrad.* 2, 17 (2007).
46. Hooper C., Killick R., Lovestone S.: The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 104, 1433 (2008).
47. Nunes M. A., Schöwe N. M., Monteiro-Silva K. C., Baraldi-Tornisielo T., Souza S. I.: Chronic microdose lithium treatment prevented memory loss and neurohistopathological changes in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PloS One* 10, 142267 (2015).
48. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem. Biodiv.* 10, 1120 (2013).
49. Berkov S., Codina C., Viladomat F., Batista J.: N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2263 (2008).
50. Cahlíková L., Pérez D. I., Štěpánková Š., Chlebek J., Šafratová M., Hošťálková A., Opletal L.: *In vitro* effect of 8-*O*-Demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *J. Nat. Prod.* 78, 1189 (2015).
51. Jalkanen A. J., Puttonen K. A., Venäläinen J. I., Sinervä V., Mannila A., Ruotsalainen S.: Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old skopolamine-treated rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 100, 132 (2007).
52. Tarragó T., Kichik N., Claasen B., Prades R., Teixidó M., Giralt E.: Bicalin, a prodrugable to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 7516 (2008).
53. Raudenská J., Javůrková A.: *Lékařská psychologie ve zdravotnictví*, str. 191. Grada, Praha 2011.
54. Josef M.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí: 4., zcela přepracované a doplněné vydání*, str. 529. Grada, Praha 2011.

55. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cell. *Phytochem. Lett.* 13, 394 (2015).
56. Lamoral-Theys D., Andolfi A., Van Goietsenoven G., Cimmino A., Le Calvé B., Wauthoz N.: Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J. Med. Chem.* 52, 6244 (2009).
57. Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.* 73, 1223 (2010).
58. Ying X., Huang A., Xing Y., Lan L., Yi Z., He P.: Lycorine inhibits breast cancer growth and metastasis via inducing apoptosis and blocking Src/FAK-involved pathway. *Sci. China Life Sci.* 11427 (2017).
59. Bolós V., Gasent J. M., López-Tarruella S., Grande E.: The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Onco. Targets Ther.* 3, 83 (2010).
60. Batista J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., De Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Rec. Adv. Pharm. Sci.* 3, 65 (2011).
61. Griffin C., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 38, 1549 (2011).
62. Nair J. J., Rárová L., Strnad M., Batista J., Van Staden J.: Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6195 (2012).
63. Cedrón J. C., Ravelo Á. G., León L. G., Padrón J. M., Estévez-Braun A.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* 20, 13854 (2015).
64. Nohýnková E., Stejskal F.: Malárie. *Interní Med.* 5, 256 (2005).

65. Sener B., Orhan I., Satayavivas J.: Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother. Res.* 17, 1220 (2003).
66. Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á. G., Estévez-Braun A.: Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5464 (2012).
67. Osorio E. J., Berkov S., Brun R., Codina C., Viladomat F., Cabezas F., Batista J.: *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochem. Lett.* 3, 161 (2010).
68. Martínková J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, str. 353. Grada, Praha 2007.
69. He J., Qi W., Wang L., Tian J., Jiao P., Liu G., Ye W., Liao M.: Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Infl. Other Respir. Vir.* 7, 922 (2013).
70. Chen D., Cai J., Cheng J., Jing C., Yin J., Jiang J., Peng Z., Hao X.: Design, synthesis and structure-activity relationship optimization of lycorine derivatives for HCV inhibition. *Sci. Rep.* 5, 14972 (2015).
71. Szilávik L., Gyuris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J.: Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 70, 871 (2004).
72. Havelek R., Seifrtová M., Královec K., Bručková L., Cahlíková L., Vávrová J., Řezáčová M., Opletal L., Bílková Z.: The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomed.* 21, 479 (2014).
73. Opletal L., Ločárek M., Fraňková A., Chlebek J., Hošťálková A., Šafratová M., Hulcová D., Klouček P., Rozkot M., Cahlíková L.: Antimicrobial activity of extracts and isoquinoline alkaloids of selected Papaveraceae plants. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1709 (2014).

74. Ločárek M., Nováková J., Klouček P., Hošťálková A., Kokoška L., Gábrlová L., Šafratová M., Opletal L., Cahlíková L.: Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1537 (2015).
75. Jegorov A., Buchta M., Sedmera P., Kuzma M., Havlíček V.: Accurate product ion mass spectra of galanthamine derivatives. *J. Mass Spectrom.* 41, 544 (2006).
76. Lee B. K. T., Goehring K. E., Ma Z.: One-step conversion of galanthamine to lycoraminone: a novel hydride-transfer reaction. *J. Org. Chem.* 63, 4535 (1998).
77. Šafratová M.: *Doktorská disertační práce*. Studium inhibičního (toxického) vlivu alkaloidů vybraných rostlin čeledi Amaryllidaceae na některé lidské enzymové systémy (*In vitro* studie) III. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2016.
78. Hrstka V.: *Diplomová práce*. Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů jednoděložných alkaloidních rostlin. IV. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2013.
79. Zavadil S.: *Diplomová práce*. Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů jednoděložných alkaloidních rostlin. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2011.
80. Tian Y., Zhang Ch., Guo M.: Comparative analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Three *Lycoris* species. *Molecules* 20, 21854 (2015).
81. Andrade J. P., Guo Y., Font-Bardia M., Calvet T., Dutilh J., Viladomat F., Codina C., Nair J. J., Zuanazzi J. A. S., Bastida J.: Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratrum*. *Phytochem.* 103, 188 (2014).
82. Sarikaya B. B., Kaya G. I., Onur M. A., Bastila J., Somer N. U.: Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 51, 276 (2013).
83. Kogure N., Katsuta N., Kitajima M., Takayama H.: Two new alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum*. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 1545 (2011).

84. Nováková D.: *Diplomová práce*. Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin I.: Alkaloidy *Narcissus jonquilla* L. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.
85. Lee T. B. K., Goehring K. E., Ma Z.: One-step conversion of Galanthamine to lycoraminone: A novel hydride-transfer reaction. *J. Org. Chem.* 63, 4535 (1998).

## 8 SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ADS	American Daffodil Society
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekurzorový protein
$\beta$ A	$\beta$ -amyloid
BACE	$\beta$ -site APP cleaving enzym
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervová soustava
COX	cyklooxygenáza
cv.	kultivar
EBM	Evidence based medicine
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
GSK-3 $\beta$	glykogensynthasa kináza-3 $\beta$
HCV	vir hepatitidy typu C
HEM	hematoencefalická bariéra
HIV	Human Immunodeficiency virus
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza

MMSE	Mini-Mental State Examination
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA receptor	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAID	nesteroidní antiflogistika
POP	prolyl oligopeptidasa
RT	retenční čas
SALAs	selective A $\beta$ lowering agents
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
TLC	tenkovrstvá chromatografie

## ABSTRAKT

Hanusová P.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. III. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2017.

Pro fytochemickou studii byla vybrána rostlina *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN za účelem izolace alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae a zjištění jejich biologické aktivity. Z 34 kg čerstvých cibulí byl připraven alkaloidní extrakt, který byl následně zpracováván pomocí sloupcové chromatografie. Preparativní tenkovrstvá chromatografie a krystalizace byla použita k izolaci látek z podfrakce 6/1. Podařilo se izolovat dvě látky v čistém stavu a na základě jejich MS, NMR analýz a optické otáčivosti byly označeny jako narwedín a lykoraminon, patřící do galantaminového strukturního typu. Lykoraminon byl z přírodního materiálu izolován vůbec poprvé. Látky byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE, BuChE a POP. Dále byly provedeny testy na protinádorovou aktivitu proti dvěma gastrointestinálním rakovinným buněčným liniím Caco-2, HT-29 (kolorektální karcinom) a antimalarickou aktivitu. Bohužel u alkaloidů narwedínu a lykoraminonu nebyla nalezena žádná zajímavá aktivita.

Klíčová slova: *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Amaryllidaceae, narwedín, lykoraminon, biologická aktivita.

## ABSTRACT

Hanusová P.: Alkaloids of Amaryllidaceae family: isolation, structural identification, biological activity. III. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2017.

For phytochemical study was selected plant cultivar *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. The aim of the work was to isolate Amaryllidaceae alkaloids in pure form and screening of their biological activities. Summary alkaloidal extract was prepared from 34 kg of fresh bulbs and separated by column chromatography. Preparative TLC and crystallization were used for the isolation of substances from subfraction 6/1. Two pure alkaloids of galanthamine structural type were obtained. The alkaloids were identified based on their MS, NMR analysis and optical rotation as narwedine and lycoraminone. Lycoraminone has been isolated for the first time from natural source. Both substances were tested for their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. Anticancer activity against two gastrointestinal cancer cell lines Caco-2 and HT-29 (colorectal adenocarcinoma) and antimalarial activity has been also measured. Unfortunately, none of isolated alkaloids showed some significant activity in biological assays.

Keywords: *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Amaryllidaceae, narwedine, lycoraminone, biological activity.