

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA  
**ALKALOIDY RODU *NARCISSUS* A ICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA**

**ALKALOIDS OF THE GENUS *NARCISSUS* AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY**

Vedúci katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Hradec Králové, máj 2019

Sabina Tanková

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu som vypracovala sama pod vedením a dohľadom PharmDr. Daniely Hulcovej, Ph.D. a akékoľvek literárne pramene a zdroje, ktoré som použila, som riadne citovala a uviedla v zozname použitej literatúry.

V Hradci Králové, máj 2019

.....

podpis

## POĎAKOVANIE

V prvom rade by som sa chcela poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce, slečne PharmDr. Daniele Hulcovej, Ph.D, ktorá bola mojou veľkou oporou a pomocou v celom procese vypracovania diplomovej práce. Patrí jej veľké ďakujem za každú voľnú chvíľu, ktorú na mňa obetovala, za jej trpezlivosť a pomoc pri vypracovaní experimentálnej časti, za všetky cenné rady, poskytnutú literatúru a mnoho ďalších.

Rovnako patrí moje poďakovanie PharmDr. Marcele Šafratovej, Ph.D., ktorá sa pri žiadnej mojej prosbe o pomoc nikdy neodvrátila chrbtom a uľahčovala a spríjemňovala mi prácu v laboratóriu.

Taktiež ďakujem doc. PharmDr. Jiří Kunešovi, CSc. a Mgr. Jane Maříkovej za meranie a spracovanie NMR analýzy a prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za meranie biologickej aktivity izolovaných látok a ďalším zainteresovaným pracovníkom Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej, ktorí sa podieľali na určovaní štruktúry, stanovovaní biologickej aktivity a za ich pomoc pri interpretácii výsledkov.

V neposlednom rade patrí ďakujem celému kolektívu Katedry farmakognozie za pomoc, úsmev, dobré rady a príjemné prostredie, ktoré mi počas práce vytvárali.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE.....</b>	<b>12</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Čeľad' Amaryllidaceae .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Rod <i>Narcissus</i>.....</b>	<b>15</b>
3.2.1 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. Dutch Master .....	17
3.2.2 Biosyntéza alkaloidov rodu <i>Narcissus</i> .....	17
<b>3.3 Biologická aktivita alkaloidov rodu <i>Narcissus</i> .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Alkaloidy rodu <i>Narcissus</i> a ich možné využitie v terapii Alzheimerovej choroby .....	22
3.3.1.1 Úvod do problematiky .....	22
3.3.1.2 Amyloidná teória a teória mikrotubulárnej nestability .....	25
3.3.1.3 Cholinergná teória .....	26
3.3.1.4 Liečba .....	27
3.3.1.5 Galantaminový štruktúrny typ .....	31
3.3.1.6 Lykorinový štruktúrny typ .....	33
3.3.2 Alkaloidy rodu <i>Narcissus</i> a ich možné využitie v terapii nádorových ochorení .....	34
3.3.2.1 Nádorové ochorenia .....	34
3.3.2.2 Lykorinový štruktúrny typ .....	35
3.3.2.3 Narciklasinový štruktúrny typ.....	37
3.3.2.4 Haemantaminový a krininový štruktúrny typ.....	39
3.3.2.5 Tazettinový štruktúrny typ .....	40
3.3.3 Alkaloidy rodu <i>Narcissus</i> a ich ďalšie biologické aktivity.....	42
3.3.3.1 Lykorinový štruktúrny typ .....	42
3.3.3.2 Haemantaminový štruktúrny typ .....	43
3.3.3.3 Montaninový štruktúrny typ .....	43
3.3.3.4 Tazettinový a narciklasinový štruktúrny typ.....	43
<b>4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Materiály a pomôcky pre izoláciu .....</b>	<b>44</b>
4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie .....	44
4.1.2 Pomocný materiál .....	44
4.1.3 Činidlá .....	44
4.1.4 Prístroje .....	44

4.1.5 Mobilná fáza pre tenkovrstvovú chromatografiu .....	45
4.1.6 Chromatografický adsorpčný materiál .....	45
4.1.7 Rastlinný materiál.....	45
<b>4.2 Metodické postupy .....</b>	<b>45</b>
4.2.1 Príprava rozpúšťadiel.....	45
4.2.2 Odparovanie .....	45
4.2.3 Príprava nalievajúcich dosiek pre preparatívnu tenkovrstvovú chromatografiu.....	46
4.2.4 Preparatívna TLC.....	46
4.2.5 Detekcia na chromatografických doskách.....	46
4.2.6 Stĺpcová chromatografia .....	46
<b>4.3 Izolácia alkaloidov .....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Príprava sumárneho extraktu.....	46
4.3.2 Stĺpcová chromatografia .....	47
4.3.3 Spracovanie podfrakcie ND 3-5/7 .....	49
4.3.3.1 Separácia alkaloidov z podfrakcie ST1.....	50
4.3.3.2 Separácia alkaloidov z podfrakcie ST2.....	50
4.3.3.3 Separácia alkaloidov z podfrakcie ST3.....	51
<b>4.4 Testovanie inhibičnej aktivity získaných alkaloidov proti cholínesterázam .....</b>	<b>51</b>
4.4.1 Chemikálie .....	51
4.4.2 Prístroje .....	51
4.4.3 Podmienky merania.....	52
4.4.4 Získanie erytrocytarnej AChE a BuChE z plazmy .....	52
4.4.5 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti AChE a BuChE .....	52
<b>4.5 Testovanie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti POP .....</b>	<b>53</b>
4.5.1 Chemikálie .....	53
4.5.2 Prístroje .....	53
4.5.3 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti POP .....	53
<b>4.6 Testovanie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti GSK-3<math>\beta</math>.....</b>	<b>54</b>
4.6.1 Chemikálie .....	54
4.6.2 Prístroje .....	54
4.6.3 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti GSK-3 $\beta$ .....	54
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Identifikácia izolovaných alkaloidov.....</b>	<b>56</b>
5.1.1 GC-MS analýza.....	56

5.1.2 Hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom.....	56
5.1.2 Nukleárna magnetická rezonancia .....	56
5.1.3 Optická otáčavosť.....	57
<b>5.2 Určenie štruktúry ST1D2.....</b>	<b>57</b>
5.2.1 NMR analýza.....	57
5.2.2 GC-MS analýza.....	57
<b>5.3 Určenie štruktúry ST1D3.....</b>	<b>58</b>
5.3.1 GC-MS analýza.....	58
5.3.2 ESI-MS analýza.....	59
<b>5.4 Určenie štruktúry ST2A.....</b>	<b>59</b>
5.4.1 GC-MS analýza.....	60
<b>5.5 Určenie štruktúry ST2B1.....</b>	<b>60</b>
5.5.1 GC-MS analýza.....	61
<b>5.6 Určenie štruktúry ST3C.....</b>	<b>61</b>
5.6.1 GC-MS analýza.....	62
<b>5.7 Biologická aktivita izolovaných alkaloidov využiteľná v liečbe Alzheimerovej choroby.....</b>	<b>62</b>
<b>6. DISKUSIA .....</b>	<b>63</b>
<b>7. ZÁVER.....</b>	<b>65</b>
<b>8. ABSTRAKT .....</b>	<b>66</b>
<b>9. ABSTRACT.....</b>	<b>67</b>
<b>10. POUŽITÁ LITERATÚRA.....</b>	<b>68</b>

## ZOZNAM SKRATIEK

AA	alkaloidy čeľade Amaryllidaceae
Ach	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
AD	Alzheimerova choroba
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	oxid hlinitý
APP	amyloidný prekursorový proteín
ATP	adenosintrifosfát
Aβ	amyloid beta
BDNF	nervový rastový faktor
BuChE	butyrylcholínesteráza
CDK	cyklín dependentná kináza
COX	cyklooxygenáza
cv.	kultivar (pestovaná odroda)
DR4	receptor smrti
EGF	epidermálny rastový faktor
FAS	receptor smrti
GC-MS	plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria
GSK	glykogen syntáza kináza
HCl	kyselina chlorovodíková
HEB	hematoencefalitická bariéra
IC <sub>50</sub>	inhibičná koncentrácia – koncentrácia spôsobujúca 50% inhibíciu
IL-6	interleukín 6
i.v.	intravenózne podanie
JAK/STAT	Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription
LB	lekársky benzín
MF	mobilná fáza
MMP-2/9	matrix-metaloproteináza-2/9
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
p-53	transkripčný faktor/ tumor supresorový gén

POP	prolyl olygopeptidáza
Rf	retenčný faktor
ROS	reaktívne formy kyslíku
RNS	reaktívne formy dusíku
SARS-CoV	koronavírus SARS (ťažký akútny respiračný syndróm)
SB-415286	syntetický arylindolmaleimid – porovnávací štandard pre inhibičnú aktivitu proti GSK-3 $\beta$
SHP-1	tyrozín špecifická proteínová fosfatáza
STAT3	transkripčný faktor (signal transducer and activator of transcription 3)
TLC	tenkovrstvová chromatografia
TWIST	transkripčný faktor
UV	ultrafialová oblasť
WHO	svetová zdravotnícka organizácia



## PREHĽAD OBRÁZKOV A TABULIEK

<b>Obrázok 1</b> - Príklady kultivarov narcisov.....	15
<b>Obrázok 2</b> - <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. a <i>Narcissus tazetta</i> L. ....	16
<b>Obrázok 3</b> - <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. Dutch Master .....	17
<b>Obrázok 4</b> - Biosyntéza alkaloidov rodu <i>Narcissus</i> .....	19
<b>Obrázok 5</b> - Štruktúrne odlišnosti haemantaminového a krinanového štruktúrneho typu .....	20
<b>Obrázok 6</b> - Štruktúrne odlišnosti tazettinového a pretazettinového typu.....	21
<b>Obrázok 7</b> - Zmeny mozgového tkaniva pri AD.....	23
<b>Obrázok 8</b> - Teórie vzniku AD .....	25
<b>Obrázok 9</b> - Vznik senilných plakov.....	25
<b>Obrázok 10</b> - Štruktúrne vzorce inhibítorov cholinesteráz používaných v liečba AD .....	29
<b>Obrázok 11</b> - Alkaloidy galantaminového štruktúrneho typu.....	32
<b>Obrázok 12</b> - Alkaloidy lykorinového štruktúrneho typu .....	33
<b>Obrázok 13</b> - Narcipavlin.....	34
<b>Obrázok 14</b> - Vplyv alkaloidov na proliferáciu testovaných nádorových línií. ....	39
<b>Obrázok 15</b> - Súhrnná TLC spojených frakcií z alkaloidného extraktu <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. Dutch Master.....	48
<b>Obrázok 16</b> - Súhrnná TLC spojených frakcií ND 3-5.....	49
<b>Obrázok 17</b> - Kontrolná TLC oddelených fáz ST1, ST2, ST3 .....	50
<b>Obrázok 18</b> - Karanin.....	57
<b>Obrázok 19</b> - GC-MS spektrum karanin.....	58
<b>Obrázok 20</b> - <i>O</i> -etyllykorenin .....	58
<b>Obrázok 21</b> - GC-MS spektrum <i>O</i> -etyllykorenin.....	59
<b>Obrázok 22</b> - ESI-MS spektrum <i>O</i> -etyllykorenin.....	59
<b>Obrázok 23</b> - Narwedín .....	59
<b>Obrázok 24</b> - GC-MS spektrum narwedín .....	60
<b>Obrázok 25</b> - Pluviín .....	60
<b>Obrázok 26</b> - GC-MS spektrum pluviín.....	61
<b>Obrázok 27</b> - <i>N</i> -demetylhomolykorin .....	61
<b>Obrázok 28</b> - GC-MS spektrum <i>N</i> -demetylhomolykorin .....	62
<b>Tabuľka 1</b> - Taxonomické začlenenie .....	13
<b>Tabuľka 2</b> - Liečba AD .....	30
<b>Tabuľka 3</b> - Vysvetlenie skratiek bunkových línií použitých v texte.....	41
<b>Tabuľka 4</b> - Podmienky stĺpcovej chromatografie .....	47
<b>Tabuľka 5</b> - Alkaloidné frakcie získané zo stĺpcovej chromatografie .....	48
<b>Tabuľka 6</b> - Zhrnutie výsledkov experimentálnej práce.....	51
<b>Tabuľka 7</b> - Inhibičná aktivita alkaloidov proti AChE, BuChE, POP a GSK-3β .....	62

## 1. ÚVOD

Rôzne druhy ochorení sprevádzajú ľudstvo už od nepamäti. Aktuálne životné tempo modernej doby sa vo veľkej miere preukazuje na zdraví a ovplyvňuje každodenné fungovanie človeka. Kým v minulosti ľudí trápili úrazy získané pri boji alebo love, infekcie či otravy, ktoré boli spôsobené konzumáciou neznámych rastlín, dnes sú pre ľudstvo hlavnými nástrahami civilizačné ochorenia. Patria medzi ne srdcovocievne choroby, obezita, diabetes mellitus, ale aj psychické a nádorové onemocnenia. Starnutie populácie prináša so sebou vyšší výskyt vekom podmienených neurodegeneratívnych ochorení ako Alzheimerova alebo Parkinsonova choroba, ktoré sú v dnešnej dobe nevyliečiteľné.

Tak, ako sa svet rozvíja v rôznych odvetviach vedy a techniky, napreduje aj oblasť farmakoterapeutická. Kedysi boli rastlinné zdroje využívané primárne ako zdroj potravy, neskôr sa u niektorých z nich spozorovali liečivé účinky, a dnes sa už rada z nich využíva v terapii najrôznejších onemocnení alebo slúžia ako predloha pri vývoji nových liečiv. Zložky, na ktorých izoláciu sa pri výskume zameriava a sú zodpovedné za farmakoterapeutický účinok, sa nazývajú sekundárne metabolity. Jedná sa o štruktúrne vysoko rozmanité zložky so širokým spektrom biologických účinkov. Pre jednotlivé sekundárne metabolity je charakteristické, že okrem špecifickej chemickej štruktúry a terapeutického efektu sa vyskytujú najčastejšie v jednej alebo v niekoľkých málo príbuzných čeľadiach. Medzi najvýznamnejšie obsahové látky získané z rastlinných zdrojov patria napríklad paklitaxel, kyselina salicylová, morfín a chinín.<sup>1</sup>

Jednu z najvýznamnejších skupín sekundárnych metabolitov tvoria látky alkaloidnej štruktúry. Alkaloidy predstavujú veľmi rozmanitú skupinu metabolitov, pre ktoré je charakteristická prítomnosť aspoň jedného dusíkatého atómu v štruktúre, ktorého konkrétna poloha sa značne líši u jednotlivých druhov alkaloidov. Ich štruktúra vychádza z dvoch aminokyselín, L-fenylalanínu a L-tyrozínu.<sup>2</sup> Názov majú odvodený od bazickej povahy väčšiny látok.

V tejto práci bola venovaná pozornosť alkaloidom isochinolinovej štruktúry, ktorá zahŕňa i skupinu špecifických Amaryllidaceae alkaloidov (AA). Vyskytujú sa hlavne v rastlinách čeľade Amaryllidaceae, medzi ktoré patrí rada okrasných rastlín ako napríklad narcisy, snežienky, bleduľa letná a pavúčia ľalia. Veľa ľudí však ani netuší, aké terapeutické zázraky sa v nich skrývajú. Biologická aktivita, ktorá je u nich popísaná, je napríklad inhibícia acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy, antimikróbne, antivirálne a antifungálne

účinky, taktiež protinádorové pôsobenie a ďalšie aktivity.<sup>2,3,4</sup> Z tohto dôvodu sú amarylkovité alkaloidy neustále podrobované ďalšiemu výskumu.

Jedným z najvýznamnejších objavov, ktorý sa týka AA, bolo zistenie biologických účinkov alkaloidu galantaminu. Po prvýkrát bol vyizolovaný z cibule rastliny *Galanthus woronovii* Losinsk. Preukázala sa u neho schopnosť inhibovať enzým acetylcholinesterázu, vďaka čomu sa stal veľmi dôležitou súčasťou liečby Alzheimerovej choroby.<sup>5</sup> Ide o jediný alkaloid čeľade Amaryllidaceae, ktorý sa doposiaľ v klinickej praxi používa. Za spomenutie určite stojí aj ďalší zástupca čeľade Amaryllidaceae, lykorin. Jedná sa o jeden z najčastejšie sa vyskytujúcich AA so širokou škálou biologických aktivít, u ktorého sa sleduje najmä jeho silný protinádorový účinok voči viacerým nádorovým líniam.<sup>6,104</sup> Spolu s haemantaminom, narciklasinom a pankratistatinom predstavujú nádejné spôsoby liečby nádorových ochorení.

Intenzívnemu výskumu v tejto oblasti sa venuje nejedno vedecké pracovisko, medzi ktoré patrí Farmaceutická Fakulta Univerzity Karlovej v Hradci Králové, kde sa konkrétne katedra Farmaceutickej botaniky s pracovnou skupinou ADINACO zameriava na štúdium jedného z potenciálnych zdrojov biologicky aktívnych látok v terapii Alzheimerovej choroby (AD), *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master.

Experimentálna časť tejto práce bola venovaná izolácii, separácii a čisteniu alkaloidov získaných z pridelenej podfrakcie sumárneho rastlinného extraktu, určeniu ich štruktúry a zmeraniu biologickej aktivity.

## 2. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

1. Izolácia alkaloidov z podfrakcie ND 3-5/7 sumárneho extraktu, získaného po spracovaní čerstvých cibúľ rastliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master.
2. Získanie najmenej jedného sekundárneho metabolitu alkaloidnej povahy v čistom stave a v dostatočnom množstve za pomoci preparatívnej tenkovrstvovej chromatografie a rekryštalizácie.
3. Podielanie sa na identifikácii vyizolovaných látok za pomoci spektrálnych a fyzikálne-chemických metód.
4. Stanovenie biologických aktivít izolovaných látok zameraných na ich inhibičný účinok proti ľudským cholinesterázam, glykogen syntáze kináze a prolyloligopeptidáze.
5. Spracovanie literárnej rešerše so zameraním na alkaloidy čeľade Amaryllidaceae, rod *Narcissus* a na ich biologickú aktivitu.

### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

#### 3.1 Čeľad' Amaryllidaceae

Tabuľka 1 - Taxonomické začlenenie <sup>7</sup>

Ríša	Plantae (Rastliny)
Podríša	Tracheobionta (Cievnaté rastliny)
Oddelenie	Magnoliophyta (Krytosemenné)
Trieda	Liliopsida (Jednoklíčnolistové)
Podtrieda	Lillidae
Rad	Asparagales (Ľalioťvaré)
Čeľad'	Amaryllidaceae (Amaryllkovité)
Rod	<i>Narcissus</i>
Druh	<i>Narcissus pseudonarcissu</i> L.
Kultivar	Dutch Master

Čeľad' Amaryllidaceae sa zaraďuje k jednoklíčnolistovým, celoročným, cibulovitým rastlinám.<sup>8</sup> Zahŕňa okolo 75 rodov a vyše 1000 rastlinných druhov.<sup>9</sup> Rastliny tejto čeľade sa vyskytujú od tropického pásma Afriky až po mierne pásmo Európy, ale rovnako sa nachádzajú aj v Južnej Amerike a Ázii.<sup>71</sup> Často sú pestované ako okrasné rastliny v byte alebo na záhradách.<sup>10</sup> Charakteristickou črtou čeľade sú výrazné obojpohlavné kvety a čiarkovité listy, ktoré môžu byť prízemné alebo stopkaté. Plodom je bobuľa alebo tobolka.<sup>7</sup> Pod túto čeľad' sú radené rody ako *Galanthus* (snežienka), *Narcissus* (narcis), *Amaryllis* (amaryllka) a *Leucojum* (bledula), ktoré podliehajú značným výskumom vďaka doposiaľ objaveným biologicky aktívnym látkam, ktoré sa v nich vyskytujú.<sup>2</sup>

Najvýznamnejšie obsahové látky čeľade Amaryllidaceae sú isochinolinové alkaloidy, ktoré sú vysoko špecifické práve pre túto čeľad', podľa ktorej dostali pomenovanie ako AA.<sup>7,10,11</sup> Objasnenie pojmu alkaloidy siaha do roku 1819, kedy W. Meissner takto pomenoval všetky zásadité, organické zložky obsiahnuté v rastlinách a zvieratách. Od tej doby sa definícia alkaloidov vyformovala, a dnes sa takto nazývajú látky alebo skupiny látok, ktoré majú vo svojej heterocyklickej štruktúre aspoň jeden atóm dusíku. Poloha dusíka je rozdielna u jednotlivých skupín alkaloidov.<sup>2</sup> Podľa údajov uvedených v literatúre bolo vyizolovaných už vyše 500 rôznych AA z rastlín patriacich do tejto čeľade. Táto čeľad' patrí

medzi jednu z 20 najdôležitejších alkaloidy obsahujúcich čeľadí.<sup>9,10</sup> Alkaloidy sa nachádzajú v celej rastline.<sup>7,10,11</sup> Od vegetačného obdobia závisí ich podiel v jednotlivých rastlinných častiach. Kým v čase vegetácie je najvyššia koncentrácia AA v zelených častiach rastliny, po jej skončení sú tieto sekundárne metabolity koncentrované hlavne v cibuli. Okrem vegetácie je ich produkcia v rastline závislá aj od druhu, ale aj kultivaru rastliny a od podmienok, ako svetlo, teplo alebo vlhkosť.<sup>3,5</sup>

Vďaka týmto obsahovým látkam je o rastliny čeľade Amaryllidaceae veľký záujem v oblasti vedy a výskumu. Veľké množstvo štúdií poukázalo na rôzne biologické aktivity, ktorými AA disponujú. Už niečo cez 200 rokov sa extrakty z cibúľ týchto rastlín využívajú v Južnej Afrike ako prostriedok tradičnej medicíny. Spomínajú sa hlavne v súvislosti s vredovou chorobou, astmou, horúčkou a kašľom.<sup>12</sup> Svoje uplatnenie v ľudovom liečiteľstve našli aj v Číne, Severnej Afrike a Strednej Amerike.<sup>13</sup> Využívajú sa na ošetrovanie rán, liečbu reumatizmu, neplodnosti, ale aj pri ďalších indikáciách.<sup>12,13,14</sup> Prvá zmienka o ich farmakologickom účinku však siaha ešte ďalej. Datuje sa do 4. storočia pred naším letopočtom a spája sa s menom Hippocrata z Kósu.<sup>6</sup> Aj napriek dlhej dobe, ktorá už od tohto obdobia uplynula, je v klinickej praxi používaný len jediný alkaloid galantamin. Uplatnenie našiel v symptomatickej liečbe AD. Okrem ich dobre známeho neurologického efektu ako inhibítory acetylcholinesterázy (AChE), sa u AA preukázala a ďalej skúma aj biologická aktivita antibakteriálna, protivírusová, protizápalová, analgetická, emetická<sup>3,13</sup>, antimalarická, antidepresívna a hlavne protinádorová a cytotoxická.<sup>2,3,4,12,15</sup>

Nesmie sa však zabúdať ani na ich toxické účinky.<sup>13,16</sup> Tie sa najčastejšie prejavujú gastroenteritídou, ktorá je sprevádzaná nevoľnosťou, zvracaním, hnačkou a nadmerným slinením. Tieto príznaky nastupujú rýchlo a odznievajú po 3 hodinách. Charakteristické sú taktiež závraty alebo rozmazané videnie, ktoré sú spôsobené nadmernou stimuláciou cholinergného systému na periférii.<sup>3,13</sup> Lokálne podráždenie sa prejavuje dermatitídou (výsevom vyrážok). Pri závažnejších otravách boli u ľudí spozorované kŕče, tras až ochrnutie.<sup>3</sup>

### 3.2 Rod *Narcissus*

Rastliny tohto rodu sa nachádzajú v nížinách, v oblasti močiarov, trávnatých porastov a lúk, ale aj vo vyššie položených miestach ako sú skalnaté svahy, až vysokohorské oblasti.<sup>3,17</sup> Je známych približne 70 až 120 druhov rodu *Narcissus*. Toto číslo zahŕňa aj hybridné druhy, keďže presný počet je ťažko určiteľný v dôsledku častého medzidruhového kríženia vo voľnej prírode.<sup>7,18</sup>



**Obrázok 1** - Príklady kultivarov narcisov<sup>27</sup> (zhora zľava) Carlton, Pink Charm, Tahiti, Barrett Browning, Suada, Slim Whitman

Väčšina druhov kvitne neskoro v zime alebo na jar, ale pár druhov sa vyznačuje aj kvitnutím v priebehu jesene ako napr. *N. serotinus* L. a *N. elegans* (Haw.) Spach.<sup>17</sup> Narcisy sú zaradované medzi zimné rastliny a toto ročné obdobie je pre ne veľmi dôležité. V priebehu zimy dochádza k zmožutneniu stonky a následne je umožnené kvitnutie. Na konci tejto fázy nastane popadanie listov a kvetov a v priebehu leta je rastlina v tzv. spiacej fáze = obdobie dormancie.<sup>3</sup>

Pod zemou sa nachádza guľatá až vajcovitá cibuľa rastliny, ktorá si vďaka pokoju udrží potrebnú vlhkosť a má zabezpečenú ochranu pred zverou. Vďaka produkcii alkaloidov v cibuli je táto ochrana znásobená hlavne pre ich značne horkú chuť. Cibuľa je pod zemou chránená tenkou šupinou hnedastej farby. Cibuľa je charakterizovaná ako komplexný rozvetvovací systém zložený z viacerých cibuľových jednotiek, pričom každá jednotka pozostáva z výhonku, ktorý je uzatvorený zásobnými orgánmi – listovými základmi.<sup>3</sup> Významná je pre obsah alkaloidov, ale je to tiež hlavný rozmnožovací orgán rastlín.

Nadzemnú časť tvoria listy, ktoré sú jednoduché, celistvookrajové so súbežnou žilnatinou a nasadajú vo forme prízemnej ružice. Väčšina druhov rodu *Narcissus* má dva až štyri listy, ale existujú aj sedem či osemlistové. Kvety sú obojpohlavné, so šiestimi

okvetnými lístkami.<sup>3</sup> Okvetné lístky sú v dolnej časti zrastené a ich farba je závislá od druhu narcisu. Priemer kvetov sa pohybuje medzi 12 – 125 mm a nachádzajú sa samostatne, ako napríklad u druhu *Pseudonarcissus*, alebo v súkvetí s 15-20 kvetmi, ako u *Narcissus tazetta* L.<sup>17</sup>



**Obrázok 2** - *Narcissus pseudonarcissus* L. a *Narcissus tazetta* L.<sup>21 22,</sup>

Rod *Narcissus* je na rozdiel od ostatných zástupcov čeľade Amaryllidaceae charakteristický prítomnosťou pakorunky, ktorá môže byť buď tvaru disku, pohára, lievika alebo trúbky. Taktiež sa jednotlivé druhy a najmä kultivary odlišujú jej rôznymi veľkosťami a usporiadaním. Často má odlišnú farbu než okvetie. Väčšina má biele, bledo alebo naopak tmavo žlté okázalé okvetie, niektoré aj výraznú vôňu. Pre pakorunku je typické intenzívnejšie žlté, oranžové alebo až červené sfarbenie. Výška, do ktorej rastliny dorastajú, sa pohybuje v rozmedzí 20 až 40 cm.<sup>3,20</sup>

Tieto rastliny sú známe predovšetkým ako okrasné, avšak ich terapeutické vlastnosti pozná už len málokto. Významné sú najmä pre obsah AA. Doposiaľ je známych viac než 100 alkaloidov získaných z rodu *Narcissus*, ktoré sú neustále podrobované ďalšiemu výskumu a ich počet neustále narastá.<sup>10</sup> Ako už bolo vyššie zmienené, Hippocrates z Kósu objavil potenciálny liečebný účinok týchto rastlín už dávno. Konkrétne použil extrakt získaný z druhu *Narcissu poeticuss* L. pre liečbu rakoviny krčka maternice.<sup>6</sup>

Okrem tohto významného milníka sú až dodnes rastliny rodu *Narcissus* dôležitým zdrojom galantaminu. Limitujúcim faktorom je vysoký dopyt po galantamine a jeho finančne nákladná syntéza. Z rodu *Narcissus* je z tohto hľadiska najvýznamnejší druh *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Carlton s optimálnou dobou zberu koncom júla a začiatkom augusta.



Okrem toho je tento druh zdrojom alkaloidov s protinádorovou aktivitou: narciklasinu a haemantaminu. Bohaté na galantamin sa ukázali z rodu *Narcissus* aj kultivary Gigantic Star, Ice Follies a Fortune.<sup>3,8</sup>

Okrem spomínaných alkaloidov, sa nachádzajú v rastlinách rodu *Narcissus* aj antioxidantne pôsobiace flavonoidy, karotenoidy a betalainy zodpovedné za sfarbenie kvetov.<sup>24,25</sup> Z toxikologického hľadiska stojí za spomenutie obsah zväzkov kryštálov šťavelanu vápenatého, ktoré sú vo forme rafidov obsiahnuté v listoch a stonkách. Spolu s alkaloidmi sú zodpovedné za ochranu rastliny pred predátormi, ale tiež spôsobujú podráždenie pokožky vo forme vyrážok alebo až granulomatózných vredov po zasiahnutí kože šťavou s ich obsahom.<sup>3,26</sup>

### 3.2.1 *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master

V tejto práci bola pozornosť venovaná druhu *Narcissus pseudonarcissus* L., konkrétne kultivaru Dutch Master. Pre tento druh sú charakteristické šedo-zelené ploché listy, samostatne vyskytujúce sa voňavé kvety, ktoré sú najčastejšie jednofarebné, výstrednej zlatožltej farby so šírkou asi 10 cm.<sup>3</sup> Tieto narcisy narastajú až do výšky 45 cm. Najcharakteristickejším znakom kultivaru Dutch Master je pakorunka v tvare trúbky a preto sa zaraďuje do skupiny tzv. "trumpet daffodils" - trubkovitých narcisov.<sup>17</sup> Je pre ňu typická dlhšia trúbka ako okvetné listy.<sup>20</sup>



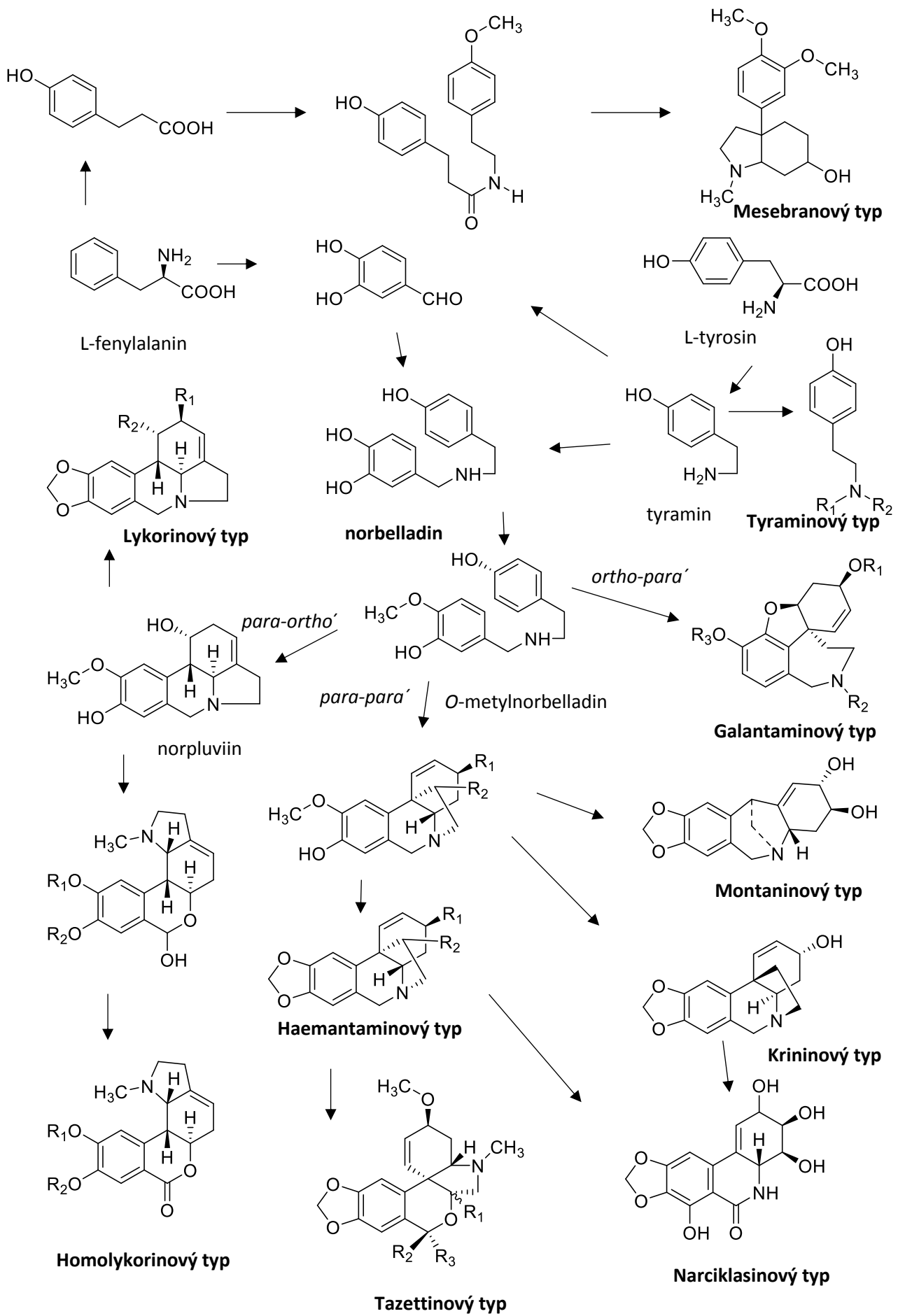
Obrázok 3 - *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master<sup>28,29</sup>

### 3.2.2 Biosyntéza alkaloidov rodu *Narcissus*

Pre alkaloidy rodu *Narcissus* je špecifická norbelladinová biosyntetická dráha, ktorá vychádza z dvoch aminokyselín: fenylalanínu a tyrozínu. Tie sú následne v niekoľkých krokoch premenené na 3,4-dihydroxybenzaldehyd a tyramín, ktorých kondenzáciou sa vytvára norbelladin, hlavný zástupca jednej z deviatich základných štruktúrnych typov AA. V ďalších

krokoch sa pôsobením enzýmov vytvára 4'-O-metylnorbelladin. Z neho sú následne odvodené ďalšie štruktúrne typy na základe troch rozdielných spôsobov intramolekulárneho oxidatívneho spojenia.<sup>2</sup>

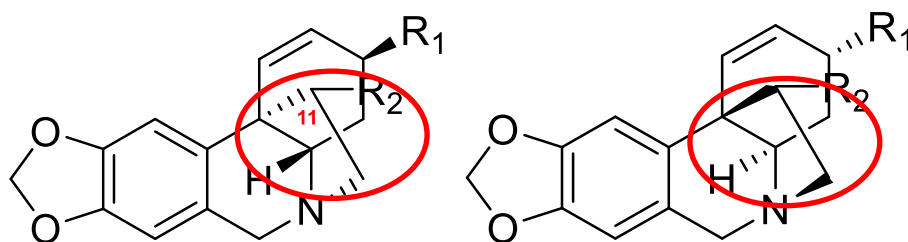
Hlavné štruktúrne typy AA, ktoré sa vyskytujú v rode *Narcissus* sú homolykorinový, galantaminový, haemantaminový, lykorinový, tazettinový, narciklasinový, norbelladinový, krininový a montaninový typ. Prvé tri spomínané sú pre tento rod najtypickejšie. V minoritnom množstve bol z rodu *Narcissus* vyizolovaný aj galantindolový, mesebranový a cheryllinový typ. Jedná sa o neobvyklé štruktúrne typy, ktoré boli vyizolované zatiaľ len z dvoch druhov narcisov, *Narcissus triandrus* L. a *Narcissus pallidulus* Graells a sú v čeľadi Amaryllidaceae veľmi vzácne.<sup>30,31</sup> V niektorých literatúrach sa dokonca uvádzajú aj nové štruktúrne typy obsiahnuté v čeľadi Amaryllidaceae, ako plicaminový, fenantridinový, fenantridónový alebo gracilinový.<sup>12</sup> Najnovšie sa podarilo získať z druhu *Narcissus poeticus* L. cv. Pink Parasol úplne nové AA, ktoré vznikli spojením galantaminového a galantindolového typu, narcipavlin a narcikachnin s významnou biologickou aktivitou proti AD.<sup>32</sup>



Obrázok 4 - Biosyntéza alkaloidov rodu Narcissus<sup>30</sup>

*Para-para'* intramolekulárne oxidatívne spojenie dalo vznik haemantaminovému, krininovému, tazzetinovému, montaninovému a narciklasinovému štruktúrnemu typu.<sup>11</sup>

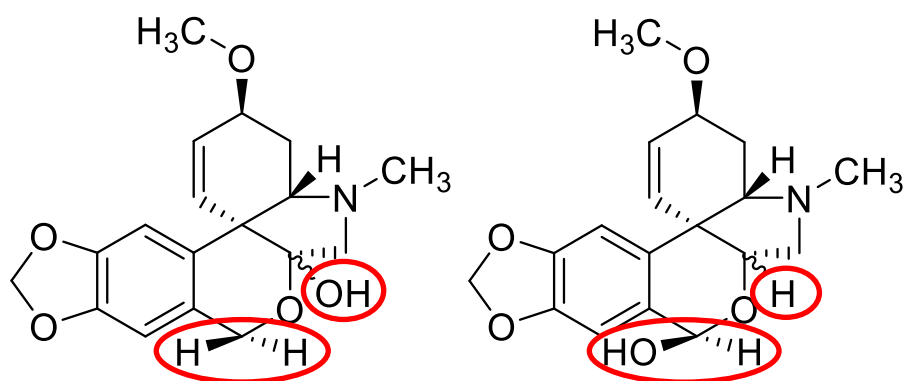
Haemantaminový a krininový štruktúrny typ sa v niektorých zdrojoch zaraďuje do jednej skupiny krinanového štruktúrneho typu, kde haemantaminový typ je označovaný ako  $\beta$ -krinanový a krininový typ ako  $\alpha$ -krinanový štruktúrny typ. Základom je 5,10*b*-etanofenantridin a jednotlivé typy sa líšia len priestorovou orientáciou etánového mostíka.<sup>6</sup>



**Obrázok 5** - Štruktúrne odlišnosti haemantaminového a krinanového štruktúrneho typu

Práve rozdiel v tomto usporiadaní hrá úlohu v cytotoxickej aktivite týchto látok. Zatiaľ čo látky krininového typu túto aktivitu nevykazujú, tak haemantamin je vysoko cytotoxický voči viacerým nádorovým líniam, ako napríklad A549, K-562, MOLT-4, HeLa, SKMEL, HepG2, MCF-7, HT-29 a ďalšie.<sup>12,94</sup> Okrem priestorového usporiadania etánového mostíka sa v ich štruktúre pre dosiahnutie protinádorového účinku vyžaduje neporušené fenantridinové jadro, keďže skrátené analógy sú podstatne menej aktívne. Taktiež je potrebná prítomnosť metyléndioxyfenylovej časti v štruktúre. Ďalej k dostatočnému efektu prispieva oxygenácia kruhu A a malý substituent na C11 s donor/akceptorovou schopnosťou pre vodíkovú väzbu.<sup>10,16,123</sup> Medzi alkaloidy haemantaminového typu patria haemantidin, haemantamin, krinamin, vittatin, maritidin a ďalšie. K alkaloidom krininového typu sa zaraďujú krinin, krinamidin, distichamin, macowin a ďalšie.<sup>12</sup>

Alkaloidy tazettinového štruktúrneho typu vychádzajú z haemantaminového typu.<sup>12</sup> Základom štruktúry je 2-benzopyrano-[3,4-c]indol.<sup>10</sup> Významnými zástupcami tohto typu sú tazettin a jeho prekursor pretazettin, ktoré sa od seba odlišujú len polohou hydroxylovej skupiny na C-6a a C-8. Aj takáto malá zmena v štruktúre výrazným spôsobom ovplyvní ich biologickú aktivitu. Kým pretazettin je zaujímavý pre svoje protivírusové a významné protinádorové vlastnosti, u tazettinu je pozorovaná antimalarická a nevýznamná cytotoxická aktivita. Medzi ďalších zástupcov patrí jongualin, obesin a ďalšie.<sup>10,11,12,23</sup> Tento typ je produkovaný hlavne rodmi *Galanthus*, *Crinum*, *Euharis* a *Hippeastrum*.<sup>33</sup>



**Obrázok 6** - Štruktúrne odlišnosti tazettinového a pretazettinového typu

Narciklasinový štruktúrny typ je odvodený od molekuly fenantridinu. Najväčší farmakoterapeutický potenciál sa predpokladá u zástupcov narciklasinu a pankratistatinu. U oboch sa v niekoľkých štúdiách preukázala silná schopnosť inhibovať nádorové bunky.<sup>4</sup>

Základný skelet montaninového štruktúrneho typu, ktorého hlavným reprezentantom je montanin, tvorí 5,11-metanomorfatridin. Za jeho najvýznamnejší účinok sa považuje antibakteriálne pôsobenie proti *Staphylococcus aureus* Rosenbach a *Pseudomonas aeruginosa* Migula.<sup>11</sup> Okrem montaninu sa uvádzajú ako zástupci tejto skupiny montabufin, pankracin a pankratinin B a C. Jedná sa o skupinu látok, ktoré sú podľa dostupných zdrojov len málo zastúpené v prírode.<sup>12</sup>

*Orto-para'* intramolekulárnym spojením *O*-metylnorbeladinu vznikol lykorinový a homolykorinový štruktúrny typ.<sup>11</sup> Za základ sa u lykorinového typu považuje pyrollo[de]fenantridinový kruh.<sup>6,34</sup> Jeho štruktúra bola detailne objasnená v roku 1956 Nagawaka a spol.<sup>35</sup> Doposiaľ bolo popísaných skoro 200 odlišných štruktúr tohto typu.<sup>36</sup> Tieto alkaloidy patria medzi najviac zastúpené druhy v amarylkovitých rastlinách, vďaka čomu mohli byť podrobené rôznym skúškam a majú zaznamenané viaceré terapeutické účinky. Najvýznamnejšie z nich sú antineoplastické, antiinflamatórne, antimikróbne vlastnosti, ale zaznamenal sa u nich aj hypotenzívny, analgetický efekt a slabší inhibičný vplyv na AChE.<sup>3,19,38</sup> Najvýznamnejší zástupci sú: lykorin, karanin, assoanin, amarbellisin, pseudolykorin, galantin, ungeremin a ďalší.<sup>12</sup>

Alkaloidy homolykorinového typu sú deriváty 2-benzopyrano[3,4-g]indolu.<sup>3</sup> Zástupcami tohto typu sú homolykorin, masonin a odulin, lykorenin a iné.<sup>12</sup> Niektorí zástupcovia majú protirakovinové účinky na nádorové línie HepG2 a MOLT-4, antivírusové a antimykotické účinky. Nevýhodou je však ich cytotoxické pôsobenia aj na nenádorové bunky fibroblastov myší.<sup>10</sup>

Galantaminový štruktúrny typ je charakteristický dibenzofuránovým jadrom, ktorý vznikol *para-ortho* intramolekulárnym spojením.<sup>11</sup> Jednotliví zástupcovia sa odlišujú rozdielnymi substituentami na C3, C7 a N9, ktoré majú vplyv na inhibičnú aktivitu týchto alkaloidov voči AChE. Hlavní zástupcovia tohto typu sú galantamin, epinorgalantamin, sanguinin a lykoramin, pričom prvý spomínaný je v súčasnosti už využívaný v terapii AD.<sup>12</sup>

### **3.3 Biologická aktivita alkaloidov rodu *Narcissus***

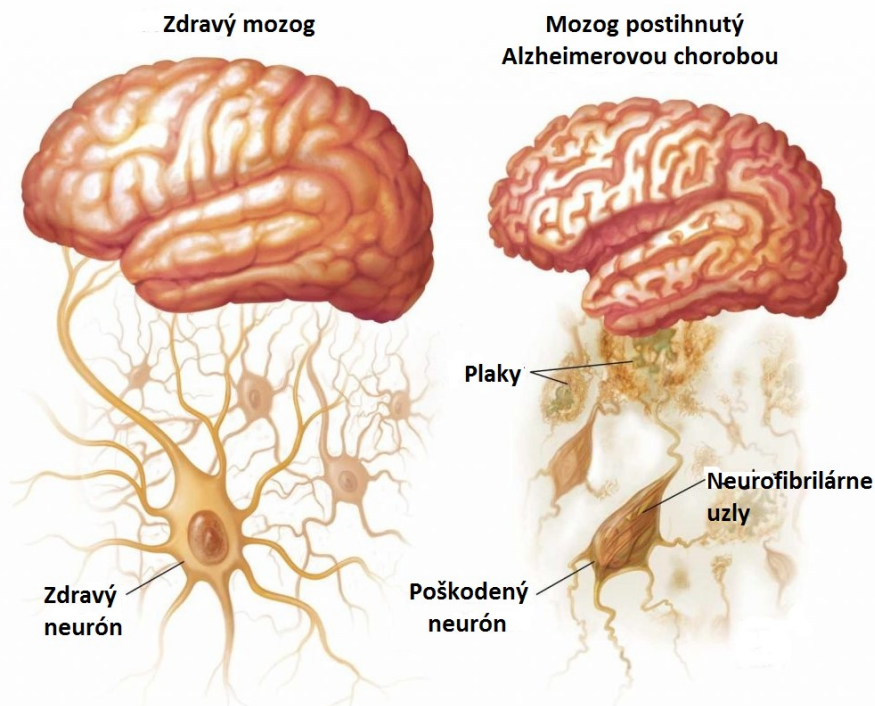
#### **3.3.1 Alkaloidy rodu *Narcissus* a ich možné využitie v terapii Alzheimerovej choroby**

##### **3.3.1.1 Úvod do problematiky**

Alzheimerova choroba je neurodegeneratívne ochorenie s neustále progredujúcim poškodením mozgu, ktoré je najčastejším dôvodom vzniku demencie.<sup>39</sup> Zo štatistických údajov z roku 2015 vyplýva, že demenciou trpí vyše 47 miliónov pacientov, z ktorých vyše 60 % trpí niektorou z foriem AD.<sup>40,41</sup> Prevalencia choroby stúpa s narastajúcim vekom. Väčšina literárnych zdrojov uvádza 60. až 65. rok života za hraničný, kedy sa u ľudí začínajú objavovať príznaky AD.<sup>39</sup> Uvádza sa, že množstvo postihnutých ľudí sa každých 5-6 rokov zdvojnásobuje.<sup>40,43</sup> Predpokladaný počet pacientov s diagnózou AD v roku 2050 je 106,8mil.<sup>44</sup>

Na základe rozvoja poškodenia mozgu sa AD rozdeľuje do niekoľkých štádií. Preklinické štádium AD začína skôr, než sa objavia prvé klinické príznaky demencie. V rámci miernej formy AD sa u pacienta prejavuje hlavne poškodenie krátkodobej pamäte s postupne zhoršujúcou sa schopnosťou zapamätať si nové veci, a prejavujú sa známky dezorientácie v čase a v priestore. V stredne ťažkom štádiu dochádza k prehĺbeniu poškodenia pamäte, k zabúdaniu dobre známych vecí ako adresa alebo mená príbuzných, pacienti blúdia vo vlastnej domácnosti. Často sa vyskytujú aj poruchy reči a zmeny osobnosti. V ťažkom štádiu AD má pacient problémy vykonávať bežné denné aktivity, hygienické návyky, trpí somatickými komplikáciami ako inkontinencia, porucha prehĺtania a stravovania, taktiež nespoznáva rodinných príslušníkov a vyúsťuje to k plnej odkázanosti na starostlivosť a pomoc rodiny alebo ošetrovateľa. Vplyvom progresie ochorenia sa u pacientov objavujú aj nekognitívne poruchy, ktoré sú spojené s výkyvmi nálady, agresivitou a postupným zhoršovaním motoriky, ktorá vo väčšine prípadov končí stratou sebestačnosti a úmrtím pacienta.<sup>45,46,47,48</sup>

Príčinou týchto prejavov je úbytok mozgovej hmoty, ku ktorému dochádza v dôsledku nevratného poškodenia a zániku nervových buniek.<sup>49</sup> Atrofiou mozgového tkaniva je najviac postihnutá oblasť mozgovej kôry a hippocampusu. Ďalej dochádza k zníženiu synaptickej plasticity a k poškodeniu tvorby rastových faktorov mozgu (napr. BDNF – nervový rastový faktor), čo sa pripisuje nedostatočnému množstvu niektorých antiapoptických faktorov, receptorov pre nervové rastové faktory a nadbytku proapoptických faktorov.<sup>39,49,50,52,53</sup> Následkom degradácie nervových buniek je poškodená hlavne tvorba neuromediátorov. Ako prvý je postihnutý acetylcholinergný systém, ktorý je charakteristický deficitom acetylcholínu (ACh).<sup>50</sup> Znížená je taktiež hladina dopamínu, serotonínu, noradrenalínu a  $\gamma$ -aminomaslovej kyseliny, čo má za následok zhoršenie kognitívnych funkcií u ľudí trpiacich AD.<sup>3</sup>



**Obrázok 7** - Zmeny mozgového tkaniva pri AD<sup>51</sup>

Kľúčovú úlohu pri rozvoji ochorenia zohráva taktiež neurotoxický amyloid beta ( $A\beta$ ), ktorý sa hromadí v extracelulárnom priestore a tvorí základ senilných plakov v mozgovom tkanive. V niektorých zdrojoch sa uvádza, že môže hrať rolu v aktivácii proteinkinázy glykogénsyntázy kinázy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) a cyklín dependentnej kinázy 5 (CDK5), ktoré sa podieľajú v hyperfosforylácii proteínu  $\tau$ .<sup>50</sup> Takto modifikovaná štruktúra proteínu  $\tau$  vedie k tvorbe párovo helikálnych filament, ktoré sú podkladom pre vznik intracelulárnych neurofibrilárnych uzlov, nazývaných aj ako tangles, ktoré v konečnom dôsledku spôsobujú

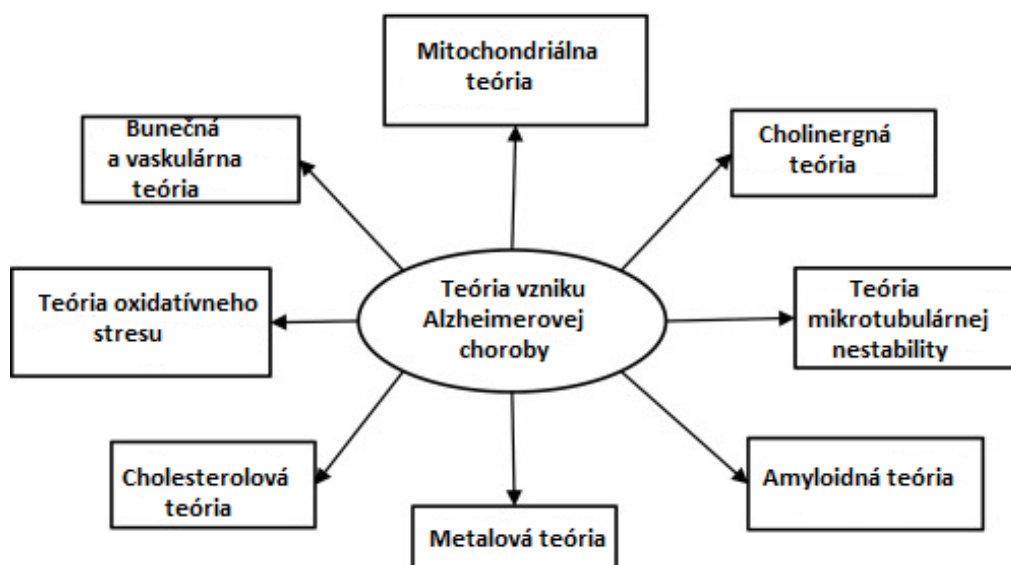
apoptózu neurónov. Príčiny, ktoré spôsobujú tieto patologické procesy v mozgu, zatiaľ nie sú úplne objasnené, ale existuje niekoľko teórií, ktoré pomáhajú vysvetliť zmeny odohrávajúce sa pri AD.

Za hlavné teórie popisujúce vznik AD sa považujú cholinergná a amyloidná hypotéza a teória mikrotubulárnej nestability, ktorým sa budem podrobne venovať v ďalšej časti diplomovej práce. V dnešnej dobe je vo vedeckej komunite veľmi diskutovaná mitochondriálna teória hlavne z dôvodu, že sa predpokladá, že poškodenie mitochondrií môže byť primárnou príčinou narušenia dôležitých intracelulárnych mechanizmov, ktoré v konečnom dôsledku vedú k prehĺbeniu neurotoxicity a k apoptóze neurónov.<sup>54</sup> Viacero literárnych zdrojov uvádza, že so stúpajúcim vekom klesá funkčnosť mitochondrií, čo môže mať spojitosť s AD. Väčší počet skúšok, ktoré boli vykonané na mozgovom tkanive pacientov s AD, poukázal na deštruktívny stav mitochondrií. Mitochondrie sú obecné hlavnými producentmi kyslíkatých radikálov a táto ich vlastnosť sa pri poškodení zvyšuje, vedie k oxidačnému stresu a k následnej aktivácii kinázy a  $\beta$ - sekretázy. Tieto informácie naznačujú, že mitochondrie môžu mať vplyv na fosforyláciu proteínu  $\tau$  a spracovanie amyloidného prekursorového proteínu (APP).<sup>55,56,57</sup>

S AD sa spája aj teória glutamátovej neurotoxicity, metalová hypotéza a ďalšie.<sup>58</sup> Medzi menej známe patria napríklad hypotézy spojené s oxidačným stresom a nadmernou tvorbou a pôsobením toxických reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (ROS, RNS) v mozgu, ktoré sú zodpovedné za poškodenie mitochondriálnych funkcií, oxidáciu proteínov v mozgu a peroxidáciu lipidov bunecnej membrány. Následkom tohto dochádza k iónovej nerovnováhe, poškodeniu glukózového transportu a k zhoršeniu energetickej nevyváženosti.<sup>42,49,56,59,60</sup> Existuje aj hypotéza popisujúca spojitosť AD a poškodenia ubiquitin-proteazómovej dráhy, ktorá slúži na odstránenie agregovaných proteínov. Poškodenie tohto systému mutáciou ubiquitínu spôsobuje akumuláciu a tvorbu neurofibrilárnych uzlov, ktorých výskyt je v priebehu choroby typický.<sup>49</sup>

Mechanizmus vzniku AD sa nedá vysvetliť len jedinou zo spomínaných teórií, je však jasné, že sa jedná o multifaktoriálne ochorenie, na ktorého vzniku sa podieľa viacero činiteľov. Detailný popis týchto teórií by presahoval kapacitu diplomovej práce. Informácie o nich sú dostupné v rôznych literárnych zdrojoch.<sup>42,49,59,60,61,62,63</sup>

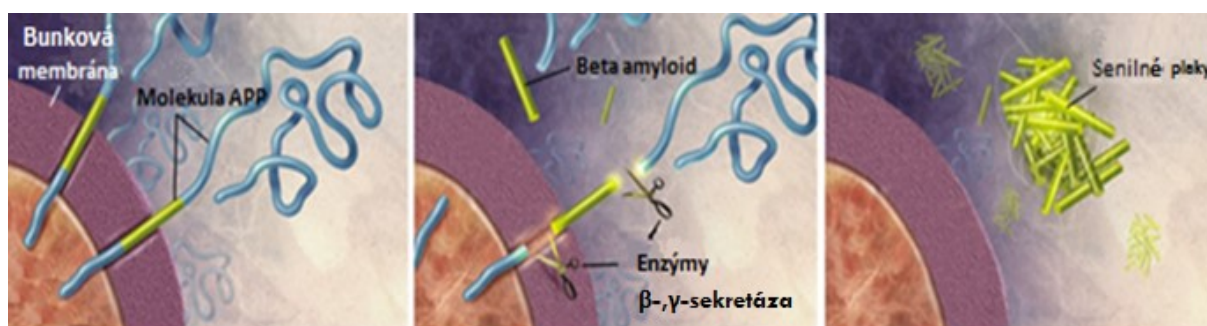




Obrázok 8 - Teórie vzniku AD <sup>64</sup>

### 3.3.1.2 Amyloidná teória a teória mikrotubulárnej nestability

Prekurzorom A $\beta$  v organizme je APP. Jedná sa o transmembránový proteín nervových buniek, ktorý je štiepený tromi rôznymi druhmi enzýmu sekretázy. Za fyziologických podmienok je štiepený  $\alpha$ - a  $\gamma$ -sekretázou tzv. neamyloidogénnou cestou, ktorá vedie k tvorbe vo vode rozpustných A $\beta$ , ktoré majú neuroprotektívnu funkciu.<sup>49,50</sup> Pri AD naopak dochádza k proteolyze APP tzv. amyloidogénnou cestou, v rámci ktorej sa uplatňuje najmä  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretáza. Výsledkom sú nerozpustné dlhšie peptidové vlákna A $\beta$ , ktoré polymerizáciou dávajú vznik vysoko toxickým oligomérom.<sup>65,66,67</sup> Tieto oligoméry sú základom pre tvorbu jadier senilných plakov v extracelulárnom matrixe, ktoré sú postupne obklopané ďalšími fragmentmi ako napr. časti rozpadnutých buniek ciev, neurity a mikroglie.<sup>68</sup> Nerovnováha medzi produkciou, clearance a agregáciou týchto oligomérov je zodpovedná za tvorbu ložísk, ktoré sú pre AD typické a nazývajú sa senilné plaky.<sup>49,56</sup> Platí priama úmera medzi počtom vytvorených plakov a funkčným postihnutím, ktoré odzrkadľuje závažnosť demencie.<sup>50</sup>



Obrázok 9 - Vznik senilných plakov <sup>69</sup>

Plaky následne podmieňujú radu neurodegeneratívnych dejov ako rozvoj sterilného zápalu, ktorý je sprevádzaný uvoľňovaním prezápalových mediátorov a reaktívnych foriem kyslíka. Taktiež vedú k aktivácii cyklooxygenáz COX-1 a COX-2 a k nadmernému uvoľňovaniu excitačných aminokyselín ako sú glutamát a aspartát.<sup>49,52</sup>

Vplyvom glutamátu dochádza k zvýšeniu aktivity *N*-metyl-D-aspartátových (NMDA) receptorov, ktoré sú dôležité pre vývoj, plasticitu a život neurónov.<sup>39,70</sup> Nadmerná stimulácia receptorov má za následok zvýšenie vtoku vápenatých iónov do nervových buniek a aktiváciou signalizačnej kaskády dochádza k usmrteniu neurónov.<sup>52</sup> NMDA receptory sú zodpovedné aj za dlhodobú potenciáciu, jeden z hlavných mechanizmov zodpovedný za učenie, ktorý je v dôsledku hyperexcitácie receptorov poškodený.<sup>50</sup>

Ako sa už vyššie spomínalo, senilné plaky môžu hrať úlohu taktiež vo formovaní neurodegeneratívnych uzlov. Teória, ktorá popisuje tento proces sa v literatúre nazýva ako teória mikrotubulárnej nestability. Behom AD dochádza k hyperfosforylácii  $\tau$  proteínu, ktorý stráca svoju stabilizačnú funkciu na mikrotubuloch. Proteín  $\tau$  sa zhlučuje v špirálne vlákna a dáva vznik neurofibrilárnym uzlom. Rozpad mikrotubulov a vzniklé neurofibrilárne uzly spôsobujú poškodenie prenosu nervového impulzu, nestabilitu celej bunky a nakoniec vedú k jej zániku.<sup>49,50</sup> Pozmenená štruktúra  $\tau$  proteínu má podľa všetkého tiež za následok stratu jeho ochrannej funkcie, ktorá je zameraná na ochranu genetickej informácie buniek pred pôsobením ROS. Táto informácia vychádza zo štúdie, v ktorej sa poukázalo na dvojnásobne vyššie poškodenie DNA u pacientov s AD v porovnaní s kontrolnou skupinou.<sup>62</sup>

### **3.3.1.3 Cholinergná teória**

Už v raných štádiách AD je postihnutá cholinergná neurotransmisia v mozgu, ktorá je potrebná pre správnu činnosť kognitívnych funkcií človeka. Toto postihnutie vzniká ako následok poškodenia cholinergných nervových buniek, čo vedie k zníženiu tvorby a uvoľňovania Ach z presynaptického zakončenia.<sup>72</sup> Ach je dôležitý neuromediátor v centrálnom aj periférnom nervovom systéme. Zodpovedá za správne fungovanie kognitívnych funkcií ako je pamäť, pozornosť, logické myslenie a ďalej ovplyvňuje úroveň bdenia, spánku aj učenia.<sup>73</sup> V priebehu AD dochádza k zníženej tvorbe cholinacetyltransferázy, ktorá je zodpovedná za syntézu Ach v neurónoch z cholínu a acetylkoenzýmu A.<sup>74</sup> Obmedzené je aj spätné vychytávanie cholínu, zo synaptickej štrbiny.

Hlavnú úlohu v degradácii neurotransmitéru majú enzýmy AChE, ktorá účinkuje hlavne v mozgu a butyrylcholinesteráza (BuChE) s pôsobením na periférii. Existujú dva typy enzýmu AChE – G1 a G4. Zatiaľ čo typ G4 prevláda u zdravých ľudí, u pacientov postihnutých AD je v prevahe G1 forma. Taktiež v priebehu AD dochádza v určitých častiach mozgu k postupnému znižovaniu koncentrácie a aktivity AChE a naopak k zvýšeniu koncentrácie BuChE, ktorý v týchto miestach preberá jej funkciu. U zdravých ľudí je BuChE v mozgu prítomný len v minoritnom množstve a hlavnú úlohu zohráva na periférii.<sup>64</sup> Zároveň je pri AD v iných častiach mozgu aktivita AChE neprimerane vysoká a spôsobuje nadmerné odbúravanie Ach.<sup>50,66,68</sup> Z týchto dôvodov dochádza k znižovaniu hladiny Ach v mozgu a k poškodeniu jeho funkcií.<sup>53</sup>

### 3.3.1.4 Liečba

Ako už bolo vyššie spomínané, AD je nevyliciteľné ochorenie a jediný spôsob, akým sa dá pomôcť pacientom s touto diagnózou, je mierniť jej prejavy a predĺžiť obdobie samostatnosti tým, že sa oddiali nástup ťažších štádií choroby.

V začiatočných štádiách choroby, kedy ešte liečba nie je hradená zo zdravotného poistenia, sa pacientom nasadzuje podporná liečba vo forme výťažkov z *Ginkgo Biloba L.*, nootropika (piracetam), antioxidanty (vitamin E, kyselina lipoová), cerebrolysin a ďalšie. Tieto liečebné prostriedky však nemajú dostatočne podložené účinky štúdiami.<sup>50</sup> Za spomenutie stojí nová možnosť podpornej liečby AD, ktorá je predmetom viacerých výskumov. Jedná sa o inhibítory prolyl oligopeptidázy (POP). Táto serinová peptidáza štiepi v mozgu látky neuropeptidovej povahy s prolinovou časťou v molekule, ktoré ovplyvňujú správne fungovanie kognitívnych funkcií ako učenie a pamäť. Taktiež majú vplyv na psychický stav a hodnoty krvného tlaku.<sup>75</sup> Z tohto dôvodu sa POP čoraz viac dáva do spojitosti s AD, ale jej vplyv na tvorbu a hladinu A $\beta$  v mozgu je v rôznych literárnych zdrojoch protichodný, čo si vyžaduje podrobnejší výskum.<sup>76,77</sup> Aj niektoré AA vykazujú inhibičnú aktivitu voči POP, napr. homolykorin, norlykoramin, odulin a 9-O-demetylgalantin.<sup>32,78</sup>

Väčšina doteraz registrovaných liečivých prípravkov, ktoré sa využívajú počas liečby miernych a stredne ťažkých štádií, je zameraná na zvýšenie hladiny Ach v mozgu mechanizmom inhibície jeho rozkladu. Tieto spomínané látky zlepšujú acetylcholinovú neurotransmisiu zablokovaním aktivity enzýmov, ktoré Ach odbúravajú. Účinné látky týchto liečivých prípravkov sa nazývajú ako inhibítory cholinesteráz a konkrétne sa jedná

o donepezil<sup>66</sup>, rivastigmin<sup>79</sup>, galantamin a huperzin A. Výsledky viacerých štúdií poukazujú na to, že inhibícia oboch enzýmov súčasne je veľmi prospešná, čo vyplýva aj z cholinergnej hypotézy vzniku choroby, ktorá poukazuje na to, že oba enzýmy majú svoj podiel v rozvoji choroby.<sup>66</sup> Do dnešnej doby má jedine rivastigmin schopnosť inhibovať aktivitu AChE aj BuChE.<sup>50</sup>

Úplne prvou látkou, ktorá bola využívaná pre svoje inhibičné vlastnosti bol takrin, ktorý však bol pre závažné nežiaduce účinky stiahnutý z klinickej praxe.<sup>80,81</sup>

Donepezil je syntetický, nekompetitívny selektívny inhibítor AChE so 70 hodinovým plazmatickým polčasom, čo umožňuje jeho podávanie jedenkrát za deň. Rovnako sa u neho preukázalo, že znižuje neurotoxické pôsobenie A $\beta$ , priaznivo ovplyvňuje spracovanie APP a znižuje koncentráciu glutamátu. Vďaka týmto rôznorodým mechanizmom jeho pôsobenia sa stala jeho štruktúra predmetom výskumu, ktorý je zameraný na objavovanie nových prípravkov schopných zasiahnuť viacero cieľov pri liečbe AD.<sup>66</sup>

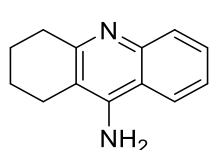
Rivastigmin je polosyntetický derivát alkaloidu fyzostigminu, u ktorého boli tiež popísané inhibičné účinky, ale kvôli nežiaducim účinkom sa stal iba predlohou pre účinnú látku s lepšou znášanlivosťou.<sup>74,82</sup> Ako už bolo vyššie spomenuté, rivastigmin inhibuje oba enzýmy podieľajúce sa na degradácii Ach, k čomu sa pripisuje jeho horšia gastrointestinálna znášanlivosť v porovnaní s ostatnými inhibítormi cholínesteráz. Z tohto dôvodu bol uvedený na trh vo forme náplasti ako prípravok Exelon Patch. Podávanie tejto liekovej formy viedlo k zníženiu nežiaducich účinkov liečiva v tráviacom trakte.<sup>39</sup> Okrem lepšej znášanlivosti je jeho výhodou aj ľahšia aplikácia a stála hladina liečiva v krvi.<sup>50</sup>

Galantamin, alkaloid čeľade Amaryllidaceae, je reverzibilný, selektívny, dlho pôsobiaci, kompetitívny inhibítor AChE a zároveň aj alosterický modulátor nikotínových receptorov, čím dochádza k zvýšeniu uvoľňovania Ach a k priamej stimulácii nervových funkcií.<sup>2,5,90</sup> Má kratší plazmatický polčas a obvykle sa podáva dvakrát denne, ale je dostupná aj lieková forma s predĺženým uvoľňovaním, ktorá je určená pre podanie jedenkrát za deň.<sup>39</sup> Okrem galantaminu sa inhibičná aktivita proti cholínesterázam prejavila aj u iných AA, ktorým sa budem venovať neskôr. Práve vďaka dobre preskúmanej cholinergnej hypotéze je navrhovanie inhibítorov cholínesteráz najpopulárnejšou stratégiou liečby AD. Vo všetkých prípadoch sú najčastejšie gastrointestinálne nežiaduce účinky a z toho vyplýva aj ich kontraindikované podávanie u pacientov s aktívnou vredovou chorobou. Tieto nežiaduce účinky sa dajú obmedziť postupným titrovaním dávky, prípadne užitím

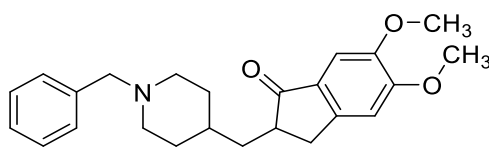
liečivých prípravkov po jedle. Rovnako treba dávať pozor na pacientov s poruchami srdcového rytmu, u ktorých by mohlo dôjsť k zhoršeniu zdravotného stavu.<sup>39</sup>

Okrem týchto sa v klinickej praxi na liečbu stredne ťažkých a ťažkých foriem AD používa liečivo memantin, ktorý je nekompetitívny antagonist NMDA receptorov. Zablokovaním receptorov dochádza k zníženému influxu vápenatých iónov do nervových buniek, čím memantin pôsobí neuroprotektívne. Používa sa buď ako monoterapia alebo sa v ťažkých štádiách ochorenia môže siahť aj po kombinovanej liečbe s inhibítormi cholinesteráz, najčastejšie s donepezilom.<sup>83</sup> Táto liečba je však finančne nákladná.<sup>50</sup>

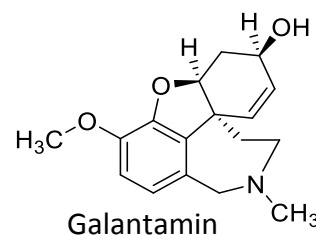
Medzi ďalšie možné prostriedky liečby patrí seskviterpénový alkaloid Huperzin A, ktorý bol izolovaný z plavúňa *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. Zatiaľ je tento alkaloid dostupný na liečbu AD iba v Číne, v USA sa nachádza v treťom štádiu klinického skúšania.<sup>58,84</sup> Okrem schopnosti selektívne a reverzibilne inhibovať AChE, čo následne vedie k zvýšeniu hladiny Ach, ovplyvňuje aj koncentráciu ďalších neuromediátorov ako sú noradrenalín a dopamín, čo taktiež prispieva k zlepšeniu kognitívnych funkcií. Taktiež znižuje glutamátom navodenú apoptózu mechanizmom antagonistu NMDA receptorov. Vo viacerých literárnych zdrojoch sa uvádza aj široké spektrum neuroprotektívnych a antioxidačných vlastností Huperzínu A, ktoré v konečnom dôsledku vedú k ochrane nervových buniek pred A $\beta$  navodenou smrťou.<sup>57,58</sup> Pozitívnymi vlastnosťami sú vysoká biologická dostupnosť po perorálnom podaní, výborná schopnosť prestupovať hematoencefalitickú bariéru (HEB) a jeho minimálne pôsobenie na periférii a tým menej cholinergných nežiaducich účinkov (minimálne hlásené závraty, git ťažkosti, bolesti hlavy).<sup>58,84,85</sup>



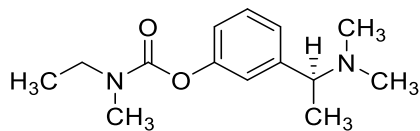
Takrin



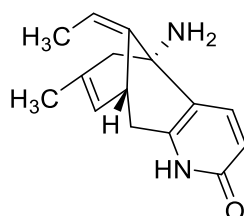
Donepezil



Galantamin



Rivastigmin



Huperzin A

**Obrázok 10** - Štruktúrne vzorce inhibítorov cholinesteráz používaných v liečba AD

**Tabuľka 2 - Liečba AD** <sup>5,43,50,66,83,85,86</sup>

Účinná látka	Mechanizmus účinku	Indikácia	Účinná denná dávka	Nežiaduce účinky
Takrin	Inhibítor AChE	-	-	Vyradený z praxe: hepatotoxicita, gastrointestinálne ťažkosti
Donepezil	Inhibítor AChE	Mierne až stredne ťažké štádium AD	1x denne 5-10 mg	Nauzea, arytmie, svalové kŕče
Rivastigmin p.o.	Inhibítor AChE a BuChE	Mierne až stredne ťažké štádium AD	2x denne 3-6 mg	Zvracanie, bolesť brucha, nauzea, hnačky
Rivastigmin emp.	Inhibítor AChE a BuChE	Mierne až stredne ťažké štádium AD	1x denne 10 mg	Minimalizované
Galantamin	Inhibítor AChE a allostérický modulátor nikotínových receptorov	Mierne až stredne ťažké štádium AD	2x denne 8-12 mg	Dyspepsia, nechutenstvo
Memantin	Antagonista NMDA receptorov	Stredne ťažké až ťažké štádium AD	2x denne 10 mg	Závraty, ospalosť, nevoľnosť, bolesť hlavy
Huperzin A	Inhibítor AChE používaný v Číne			

Okrem zmienenej farmakoterapie je u množstva pacientov súčasťou starostlivosti aj liečba antidepresívami, hlavne 3.generácia, ďalej anxiolytikami alebo antipsychotikami. Tieto prostriedky sú potrebné z dôvodu rozvoja depresie, agitácie, halucinácií, porúch spánku a ďalších, ktoré sa často u pacientov trpiacich AD rozvíjajú. Určité zdroje poukázali

na výsledky skúšok, v ktorých sa u memantinu prejavili schopnosti tieto príznaky potlačiť a preto sa odporúča, aby sa ako liečba nasadila u pacientov s poruchami správania.<sup>70</sup>

Problematikou neurodegeneratívnych ochorení sa v dnešnej dobe zaoberá množstvo výskumných spoločností. Neustále narastajúci počet postihnutých ľudí, ekonomicky zaťažujúci profil ochorenia, ale aj nové informácie o mechanizme vzniku choroby sú hnacím motorom nejednej z nich v snahe, objaviť nové možnosti liečby. Aj napriek týmto skutočnostiam neexistuje spôsob, ako AD vyliečiť. V praxi je zatiaľ používaná iba symptomatická liečba, ktorá umožňuje predĺžiť trvanie ľahšieho štádia ochorenia a zároveň oddialiť nástup tých ťažších.<sup>39,45</sup> Z tohto dôvodu je veľmi dôležité venovať pozornosť hľadaniu nových potenciálnych liečiv, ktoré by sa v terapii AD mohli uplatniť. Predmetom záujmu sú nielen liečivá, ktoré zasahujú do inhibície cholinesteráz, ale zahŕňajú aj vyššie spomínané enzýmové systémy podieľajúce sa na rozvoji AD ako napr. inhibítory  $\beta$ -sekretáz, inhibítory a modulátory  $\gamma$ -sekretáz, blokátory GSK-3 $\beta$  alebo nádejná je imunoterapia namierená proti A $\beta$  za využitia monoklonálnych protilátok.<sup>50,87</sup>

Veľmi dôležitou súčasťou terapie AD je nefarmakologická liečba, ktorá zahŕňa predovšetkým tréning kognitívnych funkcií, vytvorenie bezpečného a príjemného prostredia pre pacienta a potrebná je aj jeho správna výživa, telesná aktivita a dobrá kondícia. Nevyhnutná je spolupráca viacerých ošetrojúcich lekárov pre zaistenie ideálnej kompenzácie pridružených ochorení. Keďže v priebehu starostlivosti o pacienta s AD je vyvíjaný veľký tlak aj na rodinu alebo blízku osobu, ktorá zaisťuje starostlivosť pre pacienta, je dôležitá edukácia a spolupráca s touto osobou už od prvej chvíle. Pri voľbe akejkoľvek zo zmienovaných dostupných liečebných metód sa musí ku každému pacientovi pristupovať individuálne a zohľadňovať konkrétnu osobu žijúcu v konkrétnych podmienkach.<sup>39,88</sup>

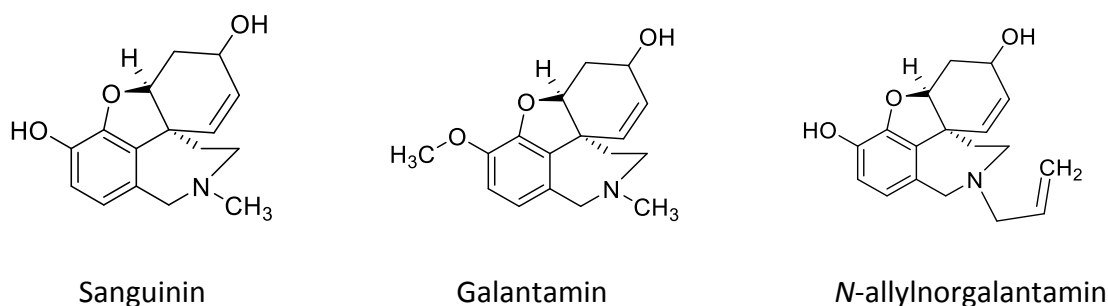
### **3.3.1.5 Galantaminový štruktúrny typ**

Ako už bolo vyššie zmienené, galantamin je jeden z liečiv využívaných v terapii AD. Tento alkaloid bol po prvýkrát izolovaný v roku 1952 z cibule rastliny *Galanthus woronowii* Losinsk. Bohatým zdrojom tohto sekundárneho metabolitu je v dnešnej dobe aj rastlina *Galanthus nivalis* L., *Leucojum aestivum* L. alebo rôzne druhy rodu *Narcissus* sp. Dostupná je už aj možnosť syntetickej výroby galantaminu, ktorá bola spustená Rakúskou spoločnosťou Sanochemia Pharmazeutika, ktorá ako prvá získala patent na jeho výrobu.<sup>5</sup> Samotná syntéza sekundárneho metabolitu je však ekonomicky veľmi náročná a z tohto dôvodu sú práve

spomínané rastliny ideálnym zdrojom galantaminu, ktoré na určitý čas vyriešia problém ekonomickej náročnosti získania látky pri vysokom dopyte syntetickou cestou.<sup>89</sup> Na trhu ho nájdeme vo forme hydrobromidovej soli.<sup>90</sup> Do dnešnej doby je v Českej republike zaregistrovaný len jeden prípravok vo forme kapsúl s predĺženým uvoľňovaním a s účinnou látkou galantamin – Galantamin Mylan (8 mg, 16 mg a 24 mg).<sup>91</sup> Mechanizmus účinku tohto alkaloidu už bol vyššie popísaný. Niektoré novšie štúdie boli zamerané na objavenie nových mechanizmov pôsobenia galantaminu. Jedna z nich poukázala na jeho schopnosť vychytávať ROS a chrániť tak neuróny pred apoptózou.<sup>92</sup>

Ďalším významným inhibítorom AChE z tejto skupiny je sanguinin, ktorý sa vyskytuje napríklad v rode *Eucharis* a *Galanthus*. V literatúre sa uvádza, že u sanguininu je inhibičná aktivita až 10násobne vyššia než u galantaminu ( $IC_{50} = 0,1 \mu M$ ), čo je vysvetľované prítomnosťou voľnej hydroxylovej skupiny, ktorá je u galantaminu substituovaná metoxylovou skupinou. Predpokladá sa, že sanguinin sa viaže na väzbové miesto AChE vodíkovými väzbami, k čomu prispieva aj spomínaná hydroxylová skupina.<sup>90</sup> Nevýhodou však je, že práve prítomnosť hydroxylovej skupiny znižuje lipofilný charakter molekuly a zabraňuje prestupu účinnej látky do mozgu.<sup>12</sup> Z tohto dôvodu sa sanguinin v praxi nevyužíva.

Zo vzťahu štruktúra-účinnok vyplýva, že prítomnosť terciárneho dusíka v štruktúre galantaminu a jeho derivátov je pre inhibičný účinok dôležitý. Vychádza to z poznatkov, ktoré poukazujú na stratu inhibičnej aktivity demetylovaného derivátu epinorgalantaminu. Naopak dva *N*-alkylované deriváty galantaminu, ktoré sa podarilo vyizolovať z rastliny *Leucojum aestivum* L., *N*-(14-metylallyl)norgalantamin a *N*-allylnorgalantamin, vykazovali silnejšiu inhibičnú aktivitu proti AChE než samotný galantamin ( $IC_{50} = 0,16 \mu M$  a  $IC_{50} = 0,18 \mu M$ ). Táto výhodná vlastnosť sa pripisuje substitúcii atómu dusíka allylovou alebo metylallylovou skupinou. Limitujúcim faktorom je však ich extrémne nízka koncentrácia v rastline, ktorá bráni izolácii dostatočného množstva týchto látok.<sup>93</sup>

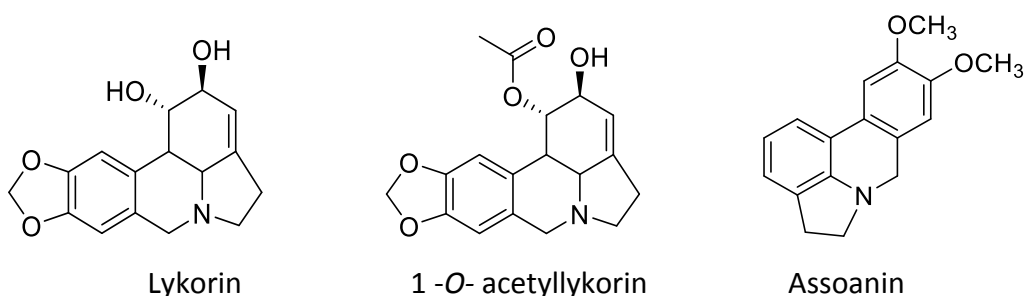


**Obrázok 11** - Alkaloidy galantaminového štruktúrneho typu



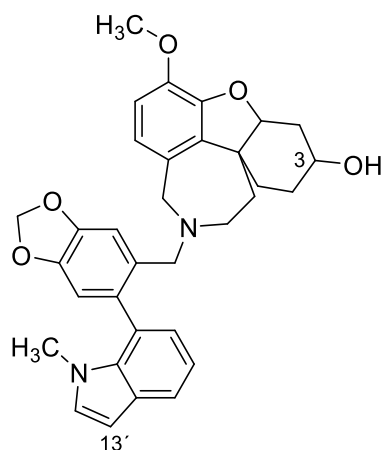
### 3.3.1.6 Lykorinový štruktúrny typ

Obece vykazuje tento štruktúrny typ alkaloidov nižšiu inhibičnú aktivitu v porovnaní s galantaminom. Táto vlastnosť sa pripisuje ku charakteru ich substituentov na C1 a C2.<sup>68</sup> Za spomenutie stojí výrazná inhibičná aktivita 1-*O*-acetyllykorinu ( $IC_{50} = 0,96 \mu M$ ). Pri porovnaní jeho schopnosti inhibovať AChE s aktivitou lykorinu a 1,2-acetyllykorinu sa zistilo, že prítomnosť acetoxy a hydroxy skupiny v polohách 1 a 2 sa vyžaduje pre správnu väzbu a inhibičnú aktivitu proti enzýmu.<sup>90</sup> Ďalšími zaujímavými zástupcami sú assoanin, u ktorého bola zameraná inhibičná aktivita  $IC_{50} = 3,87 \mu M$  a oxoassoanin s hodnotami  $IC_{50} = 47,21 \mu M$ .<sup>12,90</sup> Ich vyššia inhibičná aktivita v porovnaní s lykorinom sa pripisuje aromatickej povahe ich C kruhu, ktorá dáva určitú planaritu týmto molekulám. Zaujímavú inhibičnú aktivitu proti AChE vykázal unginorin s  $IC_{50} = 0,35 \mu M$ , ktorý má 6 až 10 násobne silnejší účinok než galantamin.<sup>15</sup> Jedna zo štúdií poukázala na určité štruktúrne predpoklady potenciálnych inhibítorov AChE zo skupiny lykorinového typu, ktorá okrem už vyššie zmienených charakterových rysov, popisuje aj priaznivý prínos intaktného pyrollo-fenantridinového jadra, acylácie na C1 a prítomnosti objemného lipofilného substituentu na C2, ktoré podporujú zvýšenú inhibičnú aktivitu lykorinových derivátov voči AChE.<sup>95,96</sup>



**Obrázok 12** - Alkaloidy lykorinového štruktúrneho typu

Ako už bolo vyššie spomínané, okrem dobre známych štruktúrnych typov sa v nedávnej dobe podarilo na pracovisku Farmaceutickej Fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové vyizolovať aj nové AA, ktorých štruktúra je tvorená kombináciou galantaminového a galantindolového typu. Tieto látky boli podrobené testom na inhibičný účinok proti cholinesterázam a z výsledkov vyplynula zaujímavá inhibičná aktivita narcipavlinu proti BuChE ( $IC_{50} = 24,4 \pm 1,2 \mu M$ ).<sup>32</sup>



**Obrázok 13** - Narcipavlin

### 3.3.2 Alkaloidy rodu *Narcissus* a ich možné využitie v terapii nádorových ochorení

#### 3.3.2.1 Nádorové ochorenia

Strach z nádorových ochorení je v dôsledku ich stúpajúcej prevalencie medzi ľuďmi stále väčší. WHO uvádza onkologické ochorenia ako druhú najčastejšiu príčinu úmrtia vo svete. Za rok 2018 podľahlo chorobe takmer 10 miliónov obyvateľov. Ľudí najviac postihuje nádor pľúc, prsníka, hrubého čreva a prostaty.<sup>97</sup> V dnešnej dobe je v rámci liečby k dispozícii možnosť chirurgického zákroku, chemoterapia, hormonálna liečba a rádioterapia. Nevýhodou je nízka selektivita liečby k nádorovým bunkám, ktorá je spojená s častým výskytom nežiaducich účinkov. Taktiež je problémom narastajúci rozvoj rezistencie novotvarov k liečbe, ktorý motivuje vedcov k snahe nájsť nové látky využiteľné v terapii rakoviny. Vďaka napredovaniu v oblasti molekulárnej biológie sa čoraz viac darí sledovať mechanizmus vzniku nádorových buniek, čo umožňuje vyvíjať látky a skúmať ich aktivitu zameranú nie na ovplyvnenie genetickej informácie buniek, ale cielene zasiahnuť signálne a regulačné proteíny zodpovedné za proliferáciu alebo inhibíciu apoptózy.<sup>98</sup> Práve vďaka tejto cielenej liečbe sa zvýši selektivita na nádorom poškodené bunky. Ideálne miesta zásahu sú rastové faktory, receptory pre rastové faktory, signálne dráhy, tiež proteíny regulujúce bunkový cyklus, novotvorbu krvných kapilár a programovanú bunkovú smrť.<sup>99</sup> Množstvo látok prírodného pôvodu sa vyznačuje protinádorovou aktivitou. Až 60 % liečiv využívaných v onkologickej praxi má prírodný pôvod.<sup>100</sup> Podľa niektorých zdrojov je ich výhodou nižší výskyt vedľajších účinkov a rezistencie na liečbu a schopnosť zvýšiť chemosenzitivitu.<sup>101</sup> Medzi najvýznamnejšie látky prírodného pôvodu využívané v onkologickej praxi patria vinblastin, vinkristin, paklitaxel, docetaxel, topotekan a ďalšie.<sup>37</sup>

Rod *Narcissus* čeľade Amaryllidaceae obsahuje taktiež látky s protinádorovým pôsobením. Zastúpené sú hlavne v lykorinovom, haemantaminovom a narciklasinovom štruktúrnom type. Najvýznamnejšími zástupcami sú lykorin, haemantamin, haemantidin, vittatin, narciklasin, pankratistatin a pretazzetin.<sup>2</sup>

### 3.3.2.2 Lykorinový štruktúrny typ

Lykorin je prvý vyizolovaný AA z roku 1877, ktorý má doteraz jeden z najviac preskúmaných účinkov.<sup>11,102</sup> Pre vedeckú komunitu je tento alkaloid zaujímavý a neustále podrobovaný ďalším testom pre výrazný antitumorový účinok voči viacerým typom novotvarov. Medzi najčastejšie spomínané typy patrí Lewisov pľúcny karcinóm, melanóm, leukémia alebo mnohočetný myelóm.<sup>6,104</sup> Lykorin ovplyvňuje nádorové bunky viacerými mechanizmami, medzi ktoré patrí navodenie apoptózy zásahom do syntézy kyseliny askorbovej na mitochondriálnej úrovni a taktiež interakciou s DNA mitochondrií a aktiváciou kaspáz.<sup>11</sup> Ako ďalší mechanizmus sa v literatúre spomína schopnosť zastaviť delenie buniek vo fáze G2/M, ktorá bola u lykorinu pozorovaná pri testovaní jeho aktivity na ľudské leukemické promyelocyty HL-60. Ako kľúčové sa ukázalo zvýšenie aktivity hlavných proapoptických mediátorov, kaspázy-8, kaspázy-9 a najmä kaspázy-3.<sup>105</sup> V ďalších experimentoch sa ukázalo, že lykorin taktiež blokuje bunkový cyklus v G0/G1 fáze u buniek ľudského mnohočetného myelómu KM3 a následne vedie k apoptóze.<sup>11</sup> Nové poznatky o antineoplastickom účinku tohto alkaloidu sa vzťahujú najmä na nádor prostaty a prsníka. Uskutočnilo sa niekoľko *in vitro* / *in vivo* štúdií na myšiach, ktoré boli zamerané na objasnenie selektívneho protitumorového mechanizmu lykorinu na 4 typické bunkové línie nádoru prostaty PC-3M, DU145, LNCaP, 22RV1 a na bunkovú líniu PNT1A normálneho ľudského epitelu prostaty. Z výsledkov vyplýva, že tento alkaloid je schopný inhibovať rast, inváziu aj migráciu nádorových buniek a tiež potlačiť ich metastazovanie so zanedbateľným vplyvom na zdravé bunky. Rovnako sa zistilo, že u buniek PC-3M navodzuje apoptózu a zosilňuje bunkovú smrť.<sup>34,107</sup> Pozitívne výsledky dali podnet na preskúmanie antitumorového účinku lykorinu aj u buniek nádoru prsníka, kde sa preukázal jeho priaznivý vplyv na potlačenie migrácie, invázie, proliferácie, kolonizácie a je schopný navodiť apoptózu aj v týchto bunkách.<sup>108</sup> Už viaceré štúdie poukázali na významný vplyv STAT3 (transkripčný faktor, ktorý zohráva významnú úlohu v rôznych bunkových procesoch ako je bunkový rast a apoptóza) pri formovaní nádorových buniek a taktiež na schopnosť lykorinu zasiahnuť do tejto

signálnej dráhy, primárne inhibíciou fosforylácie STAT3, ale tiež znížením schopnosti STAT3 viazať sa na DNA a to už pri koncentrácii 10  $\mu\text{M}$ , ktorá nemá cytotoxické účinky. Zo všetkého vyplýva, že inhibítory STAT3 majú veľký potenciál byť využívané v liečbe rôznych druhov rakoviny. Okrem iného STAT3 priamo podporuje aktivovanie transkripcie TWIST (transkripčný faktor), ktorý zohráva nenahraditeľnú úlohu pri metastazovaní, angiogenézi, extravazácii a tiež chráni rakovinovú bunku pred apoptózou.<sup>109</sup> Lykorin inhibuje expresiu TWIST a zabraňuje aktivácii signálnej dráhy JAK/STAT (bunková signalizačná cesta prenášajúca signál z receptora až do jadra, s následným ovplyvnením exprese génov) jednak prostredníctvom epidermálneho rastového faktoru (EGF), ale aj interleukínu 6 (IL-6). Down-reguluje expresiu anti-apoptických proteínov Mcl-1, Bcl-xL, ale aj zložiek zodpovedných za inváziu a migrovanie, MMP-2, MMP-9, a zvyšuje expresiu tyrozín špecifickej proteínovej fosfatázy (SHP-1), ktorá funguje ako tumor supresor.<sup>19</sup> Z tohto všetkého vyplýva, že lykorin má vysoký potenciál v boji proti nádorovým ochoreniam a tiež má predpoklady na zaradenie do klinického testovania ako nádejné cytostatikum. V literatúre sa spomínajú aj polosyntetické deriváty lykorinu, ktoré boli vytvorené za účelom testovania vzťahu štruktúra-účinnok a ovplyvňovania jeho vlastností. Za zmienku stojí hydrochloridová soľ lykorinu, ktorá pri *in vitro* testovaní preukázala schopnosť potlačiť novotvorbu ciev a proliferáciu Hey1B buniek nádoru vaječníkov a to v koncentrácii  $\text{IC}_{50} = 1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ .<sup>110</sup>

Z ďalších alkaloidov lykorinového typu sa spomínajú napr. pseudolykorin, ungeremin, galantin, karantin<sup>11</sup> a amarbellisin<sup>6</sup>. Predpokladá sa, že tieto látky by mohli poskytnúť určitý štruktúrny základ pre budúce liečivá, ktoré budú určené na liečbu nádorových ochorení so zlou prognózou, ako sú melanóm, glioblastóm, nemalobunkový karcinóm pľúc alebo metastatické nádory. Výsledky štúdie síce preukázali protinádorovú aktivitu spomínaných alkaloidov, avšak ani jeden z nich nemal tak silný účinok ako samotný lykorin.<sup>6</sup> Protinádorový účinok je u pseudolykorinu sprostredkovaný blokádou proteosyntézy, ale s rozdielnym miestom väzby než má lykorin. Ungeremin je hlavný metabolit lykorinu, ktorý vzniká jeho oxidáciou. Táto látka vykazuje len čiastočnú cytotoxickú a cytostatickú aktivitu lykorinu voči leukémii, než je to popísané u lykorinu.<sup>11</sup> Preukázaná bola u neho aj cytotoxická aktivita proti Ehrlichovmu karcinómu a Lewisovmu pľúcnemu karcinómu. Táto istá štúdia popísala jeho významnú aktivitu proti dvom žalúdočným nádorom, nádorom čreva (CXF280), vaječníkov

(OVFX1023) a pankreasu (PAXF546), taktiež proti HL-60, MOLT-4, K-562 a U-937 nádorovým bunkovým líniam, s hlavným mechanizmom pôsobenia ako inhibítor topoizomerázy II $\beta$ .<sup>102,106</sup>

### 3.3.2.3 Narciklasinový štruktúrny typ

Najvýznamnejší zástupca tohto štruktúrneho typu je narciklasin, ktorý bol po prvýkrát vyizolovaný z rodu *Narcissus* v roku 1967.<sup>111</sup> Tento alkaloid bol izolovaný taktiež pod meno lycoricidinol, ktorý sa ukázal byť identický s narciklasinom. Najvýznamnejší efekt, pre ktorý je narciklasin podrobovaný neustálemu výskumu je jeho protirakovinová aktivita už v nanomolárnych koncentráciách. Prvotne bol jeho účinok popisovaný ako schopnosť zablokovat' mitotické delenie buniek.<sup>4,111</sup> Od štúdií, ktoré jeho aktivitu pripisovali schopnosti inhibovať proteosyntézu blokovaním tvorby peptidových väzieb v ribozóme, cez publikácie, ktoré túto aktivitu potvrdili a rozšírili o nové poznatky, sa nakoniec v roku 2014 zistilo, že narciklasin inhibuje tvorbu peptidovej väzby v procese elongácie, blokádu peptidyltransferázy, väzbou na 60S ribozomálnu podjednotku tRNA na mieste A.<sup>102</sup> V literatúre sa spomína, že koncentrácia narciklasinu vyššia než 1  $\mu$ M spôsobí apoptózu rakovinových buniek aktiváciou receptorov smrti (Fas a DR4) s následnou aktiváciou kaspázy-8. Táto aktivita sa preukázala u buniek adenokarcinómu prs MCF-7 a u nádorových buniek prostaty PC-3. Taktiež bola testovaná aktivita na fibroblastoch (nenádorové bunky), u ktorých sa cytotoxický efekt nepreukázal, čím sa potvrdil jeho vysokoselektívny vplyv na nádorové bunky, čo sa pripisuje absencii dráhy receptorov smrti u zdravých buniek. Z nedávnych štúdií vyplýva, že je schopný navodiť apoptózu a pôsobiť protinádorovo aj na HL-60 a HSC-2 už v nízkych koncentráciách, mechanizmom štiepenia DNA a aktiváciou kaspázy-3.<sup>4,112</sup> Tento protinádorový efekt zahŕňa schopnosť inhibovať proliferáciu buniek, aj ich migráciu zásahom a dezorganizáciou aktínového cytosketu bunky.<sup>113</sup> Predmetom rôznych štúdií bol aj protinádorový účinok narciklasinu na veľmi agresívny nádor mozgu (GBM), ktoré preukázali, že tento alkaloid je schopný preniknúť cez HEB, zastaviť rast a predĺžiť životnosť testovaných myší.<sup>2,112</sup> Veľkou výhodou narciklasinu je jeho malá toxicita voči nenádorovým bunkám. Vedľajšie účinky skúmané na potkanoch sa objavili vo vyšších dávkach: piloerectia, hnačka, žalúdočné ťažkosti, zmena krvného obrazu.<sup>4</sup>

Aj napriek snahám o zlepšenie biologickej aktivity modifikáciou štruktúry, mala veľká väčšina zlúčenín slabšiu protinádorovú aktivitu. Aj vďaka týmto snahám sa zistil určitý vzájomný vzťah medzi štruktúrou a účinkom, ktorý musí byť zachovaný. Prítomnosť troch

hydroxylových skupín na C kruhu sa zdá byť veľmi dôležitou súčasťou štruktúry. Pri akýchkoľvek snahách odstrániť alebo nahradiť tieto funkčné skupiny sa aktivita alkaloidu znížila. Jedine narciklasin-7-O-glukosid prejavoval *in vivo* zrovnateľnú aktivitu s pôvodnou štruktúrou, ale mal o niečo lepšiu biologickú dostupnosť. Rovnako potrebná sa zdá byť aj S-konfigurácia na C2 a laktámová karbonylová funkčná skupina bez substitúcie na dusíku. Optimálne pre nádorovú aktivitu sa javí prítomnosť voľnej fenolickej OH skupiny na C7.<sup>4,116</sup>

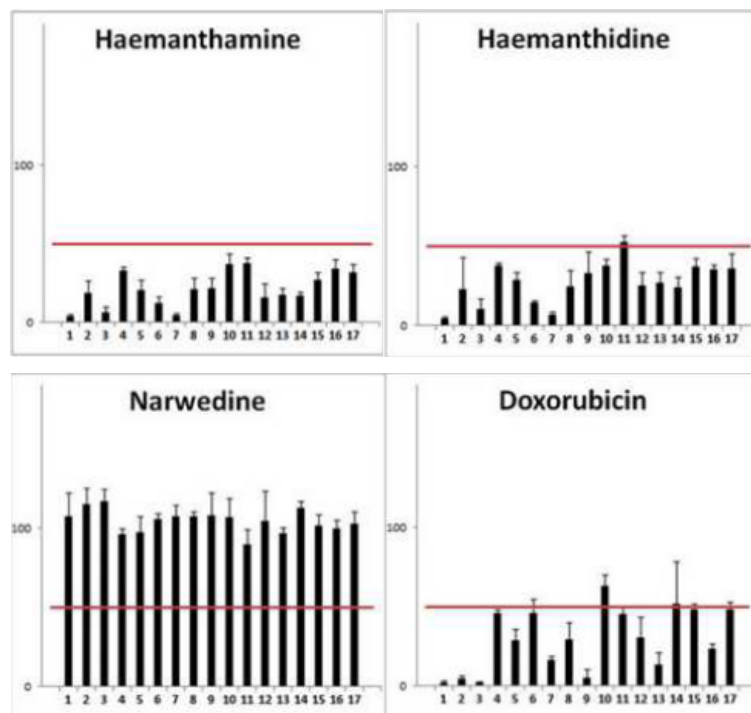
Ďalším významným zástupcom s protinádorovou aktivitou je pankratistatin, ktorý je momentálne predmetom pokročilého klinického hodnotenia.<sup>117</sup> McLachlan et al. testoval jeho pôsobenie na ľudské fibroblasty a z výsledkov vyplynulo, že pankratistatin vykazuje nízku toxicitu k zdravým bunkám. Rovnako sa zistilo, že je schopný navodiť programovanú bunkovú smrť a to najmä v nádorom zasiahnutých bunkách. Zo štúdií vyplýva, že za selektivitu je zodpovedný fenantridinový skelet.<sup>11,118</sup> V snahe nájsť efektívny spôsob liečby onkologických chorôb boli predmetom rôznych štúdií mitochondrie nádorových buniek. Práve tieto štúdie poukázali na biochemické, molekulárne a genetické odlišnosti mitochondrií nádorových a nenádorových buniek, ktoré by mohli predstavovať selektívne miesto zásahu pri protinádorovej liečbe.<sup>119,120</sup> Z tohto dôvodu sa predpokladá, že mitochondrie by mohli byť hlavným miestom pôsobenia pankratistatinu.<sup>118,121</sup> Pankratistatin taktiež indukuje u nádorovej línie buniek ľudského neuroblastómu (SHSY-5Y) aktivitu kaspázy-3 a proteazómu, zvyšuje hladinu ROS v nádorových bunkách a znižuje hladinu adenosintrifosfátu (ATP) v mitochondriách, čím spôsobuje poškodenie ich funkcie. Siedlakowski et. al. popisuje synergické pôsobenie pankratistatinu s prípravkom Tamoxifen pri terapii nádoru prsníka.<sup>122</sup> V rastlinnom materiáli je nízky obsah pankratistatinu, čo obmedzuje jeho ďalšie testovanie. V dnešnej dobe bol už pripravený jeho syntetický derivát, cyklická fosfátová soľ pankratistatinu s významným vplyvom na rast nádorových buniek.<sup>12</sup>

Narciprimin je štruktúrne veľmi podobný pankratistatinu. Z tohto dôvodu bol podrobený monitorovaniu biologickej aktivity proti nádorovým bunkám HeLa, MCF-7 a G-361, u ktorých sa preukázali len slabé cytotoxické účinky s  $IC_{50} > 50 \mu M$ . Z týchto výsledkov vyplynuli niektoré vzťahy medzi štruktúrou a účinkom. Narciprimin je charakteristický nenasýteným uhlovodíkovým cyklom bez polyhydroxy skupín, čo má za následok jeho rovinné usporiadanie. Práve tieto odlišnosti predurčujú rozdielnu

protinádorovú aktivitu. Rozdielne sú tieto dve látky aj v mechanizme, keďže u narciprimin sa ukázala schopnosť inhibovať topoizomerázu.<sup>123</sup>

### 3.3.2.4 Haemantaminový a krininový štruktúrny typ

Alkaloid haemantamin bol prvýkrát získaný z rastliny *Haemanthus x hybridus* Wittm. a neskôr už z viacerých rastlinných rodov ako *Narcissus*, *Crinum* alebo *Zephyranthes*.<sup>6</sup> Haemantidin je derivát haemantaminu s hydroxylovou skupinou na C6 a s o niečo nižšou protinádorovou aktivitou, ktorá sa pripisuje práve prítomnosti hydroxylovej skupiny. Jedna zo štúdií, ktorá bola zameraná na hodnotenie ich antiproliferatívneho účinku na 17 rozdielnych nádorových línií, vyhodnotila ich aktivitu s hodnotami IC<sub>50</sub> pre haemantamin od 0,3 μM do 9,8 μM a u haemantidinu od 1,3 μM do 9,7 μM. Pri *in vitro* testoch mali oba alkaloidy najvýraznejšiu aktivitu voči bunkám kolorektálneho adenokarcinómu HL-29. Haemantamin sa ďalej ukázal ako silné antiproliferačné činidlo proti leukémii (HL-60, Jurkat, MOLT-4), ďalej proti nádorovým bunkám prsníka (MCF-7, BT-549).<sup>124</sup>



**Obrázok 14** - Vplyv alkaloidov na proliferáciu testovaných nádorových línií<sup>124</sup> Doxorubicín bol použitý ako kontrolná látka. (1. HL-60, 2. Jurkat, 3. MOLT-4, 4. A549, 5. H1299, 6. COLO-201, 7. HT-29, 8. SW-480, 9. AGS, 10. PANC-1, 11. A2780, 12. HeLa, 13. BT-549, 14. MCF-7, 15. MDAMB-231, 16. SAOS-2, 17. NHDF).

Po týchto pozitívnych výsledkoch sa haemantamin použil v *in vivo* štúdií na myšiach, ktorá sa uskutočnila na Ehrlichových bunkách nádoru prsníka. Výsledok bol veľmi nepriaznivý, haemantamin nemal prakticky žiadny vplyv na progresiu ochorenia a to ani v dávkach, ktoré boli blízke už toxickým.<sup>124</sup> V jednej novej štúdií išlo o snahu objasniť

farmakokinetiku haemantaminu po i.v. podaní bolusovej dávky 10 mg/kg potkanom.<sup>125</sup> Z výsledkov vyplynulo, že nedostatočná aktivita alkaloidu pri *in vivo* skúške na Ehrlichových bunkách môže súvisieť s rýchlym poklesom koncentrácie haemantaminu v plazme a s následným vylúčením do moču, čo negatívne ovplyvňuje jeho biologickú dostupnosť.<sup>124,125</sup> Ďalšia experimentálna práca popisuje protinádorový potenciál haemantaminu a haemantidinu v bunkách Jurkat s nedostatkom p-53. Z výsledkov vyplynulo, že oba alkaloidy znižujú životaschopnosť buniek aj membránový potenciál mitochondrií, spomaľujú ich proliferáciu, pričom dochádza k akumulácii buniek vo fázach G1 a G2 bunkového cyklu a indukujú apoptózu prostredníctvom aktivácie kaspáz. Vyšší účinok proti T-bunkám leukémie vykazoval haemantidin.<sup>94</sup>

Ďalší zo spomínaných alkaloidov s protinádorovým účinkom je krinamin. Rovnako ako haemantamin, už v mikromolekulárnych koncentráciách má schopnosť indukovať apoptózu. Ako hlavný protirakovinový mechanizmus sa opisuje potlačenie tvorby oxidu dusnatého, podpora aktivity oxid dusnatý syntázy v lipopolysacharidmi aktivovaných makrofágoch.<sup>12</sup>

Z alkaloidov haemantaminového štruktúrneho typu sa v literatúre protinádorový účinok spomína aj u vittatinu, hlavne v spojitosti s bunkami nádorových línií HT-29 a pľúcneho karcinómu. Jeho mechanizmus účinku však zatiaľ nie je presne známy.<sup>2</sup>

Medzi alkaloidy krininového štruktúrneho typu sa zaraďuje distichamin, ktorý aj napriek opačnej stereochemii etánového mostíka má pozoruhodné cytotoxické vlastnosti, ktoré sú pre tento štruktúrny typ výnimočné. Jeho aktivita sa preukázala na bunkách akútnej lymfoblastickej leukémie (CEM). Okrem nich je tento alkaloid účinný aj u nádorových línií buniek HeLa s  $IC_{50} = 2,2 \mu M$  a G-361 s  $IC_{50} = 14,7 \mu M$ . Výsledok testovania poukázal na schopnosť distichaminu zasiahnuť do bunkového cyklu a navodiť apoptózu aktiváciou kaspázy 3/7, ktorá v konečnom dôsledku spôsobí fragmentáciu DNA. Nežiaducou vlastnosťou je aj cytotoxicita voči ľudským fibroblastom, načo sa nemôže zabúdať. Tento alkaloid je zaujímavý aj preto, že sa v rastlinách čeľade Amaryllidaceae vyskytuje len veľmi zriedka a doposiaľ bol vyizolovaný len z *Boophone disticha* L.f.<sup>123</sup>

### 3.3.2.5 Tazettinový štruktúrny typ

Najvýznamnejší zástupcovia tohto štruktúrneho typu sú tazettin a pretazettin. Tazettin nevykazuje žiadnu výraznú cytotoxickú aktivitu pri porovnaní s jeho biosyntetickým prekursorom pretazettinom, ktorý je najaktívnejší AA proti bunkám nádorovej línie MOLT-4.



Okrem toho má veľmi vysokú cytotoxickú aktivitu na bunky Rauscher leukémie a Lewisovho karcinómu. Taktiež bola u neho preukázaná schopnosť inhibovať rast nádorových buniek HeLa a zvyšovať aktivitu doxorubicínu.<sup>10</sup>

**Tabuľka 3** - Vysvetlenie skratiek bunkových línií použitých v texte

<b>Skratka bunkovej línie</b>	<b>Význam</b>	<b>Skratka bunkovej línie</b>	<b>Význam</b>
A-549	Bunky pľúcneho karcinómu	Jurkat	T-lymfoblastická leukémia
BT-549	Bunky karcinómu prs	K-562	Chronická myeloidná leukémia
Caco-2	Bunky kolorektálneho karcinómu	KM-3	Ľudský mnohopočetný karcinóm
CXF 280	Nádor čreva	LNCap	Bunky karcinómu prostaty
DU-145	Bunky karcinómu prostaty	MCF-7	Bunky adenokarcinómu prsníka
GBM	Nádor mozgu	Mcl-1	Bunky myeloidnej leukémie
G-361	Bunky malígneho melanómu	MOLT-4	Akútna T bunková leukémia
HeLa	Bunky nádoru krčka maternice	OVFX 1023	Nádor vaječníka
HepG2	Bunky karcinómu pečene	PAXF 546	Nádor pankreasu
Hey1B	Bunky nádoru vaječníkov	PC-3M	Bunky karcinómu prostaty
HL-60	Bunky akútnej premyelocytárnej leukémie	PNT1A	Bunky normálneho ľudského epitelu prostaty
HSC-2	Krvné kmeňové bunky	SHSY-5Y	Bunky ľudského neuroblastómu

HT-29	Bunky kolorektálneho adenokarcinómu (p53 mutantný)	SKMEL	Bunky ľudského kožného melanómu
22RV1	Bunky karcinómu prostaty	U937	Bunky myeloidnej leukémie

### 3.3.3 Alkaloidy rodu *Narcissus* a ich ďalšie biologické aktivity

Rozvoj bakteriálnej, vírovej, ale aj parazitárnej rezistencie voči liečivám používaných v terapii stále stúpa. Problém rovnako predstavuje vývoj nových účinných zložiek využiteľných v terapii pre svoju ekonomickú náročnosť, nutnosť selektívneho zásahu poškodených buniek a tiež pre vysokú variabilitu patogénov. Rada antimikróbnych liečiv využívaných v dnešnej dobe má prírodný pôvod. Z tohto dôvodu je v popredí záujmu vedcov a vývojárov objaviť a zaviesť do praxe nové potenciálne aktívne látky. Zaujímavú aktivitu vykazujú niektoré AA.

#### 3.3.3.1 Lykorinový štruktúrny typ

Z tohto štruktúrneho typu je zaujímavý lykorin a amarbellisin. Okrem spomínaného protirakovinového účinku sa do širokého spektra farmakologických účinkov lykorinu radí aj jeho antimikróbne pôsobenie. Z vírusov má najsilnejší vplyv na RNA víry rodu flavavírus, ktoré sú okrem iného zodpovedné aj za kliešťovú encefalitídu. Sľubný efekt má na vírus detskej obrny alebo koronavírus SARS-CoV. Pôsobí mechanizmom zablokovania replikácie genetickej informácie vírov a inhibíciou tvorby bielkovín.<sup>2,10,11</sup>

Protiparazitálna aktivita lykorinu je zameraná na pôvodcu tropickej malárie *Plasmodium falciparum* Welch.<sup>11</sup> Spolu s haemantaminom majú dobrý potenciál byť využívané ako antimalarická liečba jak u chlorochin senzitívnej tak u chlorochin rezistentnej formy. Z výsledkov štúdií vyplýva, že pre aktivitu je potrebná metylendioxibenzenová časť spolu s terciárnym dusíkom bez metylového substituentu. V štruktúre galantaminu a tazettinu tieto časti chýbajú, čo má za následok slabú aktivitu proti tomuto parazitovi.<sup>103</sup>

Usmrcujúci efekt má lykorin na príčinu spavej nemoci, *T.brucei* Plimmer & Bradford.<sup>10</sup> Účinný je proti prvoku spôsobujúceho sexuálne prenosné ochorenie trichomoniázu.<sup>2</sup> Svoje antimykotické vlastnosti preukázal na *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen alebo na *Candida albicans* (C. P. Robin)Berkhout.

Amarbellisin, alkaloid získaný z cibule rastliny *Amaryllis belladonna* L. je zaujímavý pre aktivitu namierenú na Gram-negatívne baktérie typu *E. coli* (Migula 1895) Castellani

a Chalmers alebo na Gram-pozitívneho *Staphylococcus aureus* Rosenbach. Z antifungálnych vlastností je popísaná aktivita proti *C. albicans* (C. P. Robin) Berkhout.<sup>114</sup>

### 3.3.3.2 Haemantaminový štruktúrny typ

V literárnych zdrojoch sa uvádza významný *in vitro* antimalarický účinok proti kmeňu *P. falciparum* Welch. u haemantaminu s  $IC_{50} = 1,3 \mu M$ , haemantidinu s  $IC_{50} = 1,2 \mu M$ , ďalej u 11-hydroxyvittatinu a ďalších. Výsledok testovania antimalarickej aktivity viacerých derivátov týchto alkaloidov poukázal na určité znaky štruktúra-účinok. Podmienkou účinku je násobná väzba medzi C1 a C2 v D kruhu, metoxy skupina na C-3 a donor vodíkovej väzby, ako je hydroxyskupina, na C11. Derivát 11-hydroxyvittatinu s dvomi dusíkatými skupinami na C3 a C11 vykazoval najsilnejšiu aktivitu s hodnotou  $IC_{50} = 0,8 \pm 0,6 \mu M$ .<sup>115</sup>

Vittatin a jeho 11-hydroxy derivát je zaujímavý pre svoju aktivitu proti *Staphylococcus aureus* Rosenbach a *C. albicans* (C. P. Robin) Berkhout. Z ďalších alkaloidov stojí za spomenutie distichamin, ktorý sa javí ako nové širokospektrálne pôsobiace antibakteriálne činidlo s účinkom proti *Klebsiella pneumoniae* Trevisan, *E.coli* (Migula 1895) Castellani a Chalmers a *Staphylococcus aureus* Rosenbach. Krinamin prejavil sľubnú aktivitu proti dvom kmeňom *P. falciparum* Welch., ktorá je o niečo slabšia než aktivita lykorinu.<sup>12,16</sup>

### 3.3.3.3 Montaninový štruktúrny typ

U menej spomínaného montaninového typu sa pri testovaní aktivity alkaloidu pankracin, prejavili antibakteriálne vlastnosti zamerané hlavne proti *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Pseudomonada aeruginosa* Migula a baktérii *E.coli* (Migula 1895) Castellani a Chalmers. Účinok proti pôvodcovi malárie, *P. falciparum* Welch, je v porovnaní s antibakteriálnym pôsobením málo výrazný. Rovnako je aktívny proti *Trypanosoma brucei rhodesiense* Plimmer & Bradford a *T. cruzi* Chagas. Ďalšia zo štúdií doplnila jeho protimikróbnu aktivitu proti *C. albicans* (C. P. Robin) Berkhout.<sup>2,11</sup>

### 3.3.3.4 Tazettinový a narciklasinový štruktúrny typ

Medzi alkaloidmi tazettinové typu sú v tomto smere aktívne jak tazetin, ktorý mal testovanú antimalarickú aktivitu proti *P. falciparum* Welch., tak pretazettin, ktorý sa preukázal ako silný inhibítor reverznej transkriptázy a látka účinná proti flavovírusom.<sup>12</sup>

Z antibakteriálneho hľadiska sú alkaloidy zastúpené v narciklasinovom type menej zaujímavé. Uvádza sa antifungálny účinok narciklasinu proti kvasinkám typu *Cryptococcus neoformans* Vuill. a protivírová aktivita proti RNA vírom typu flavavíry a bunjavíry.<sup>11</sup>

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Materiály a pomôcky pre izoláciu

#### 4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie

- Acetón p.a. (Ac) (Penta a.s.)
- Amoniak p.a. (NH<sub>3</sub>) (Penta a.s.)
- Cyklohexán p.a. (cHx) (Penta a.s.)
- Diethylamín p.a. (Et<sub>2</sub>NH) (Penta a.s.)
- Dichlórmétán p.a. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Penta a.s.)
- Destilovaná voda (H<sub>2</sub>O)
- Ethanol 95%, denaturovaný metanolom, p.a. (EtOH) (Penta a.s.)
- Ethylacetát p.a. (EtOAc) (Penta a.s.)
- Chloroform p.a. (CHCl<sub>3</sub>) (Penta a.s.)
- Metanol p.a. (MeOH) (Penta a.s.)
- Toluén p.a. (To) (Penta a.s.)
- Trifluoroctová kyselina p.a. (TFFA) (Penta a.s.)

#### 4.1.2 Pomocný materiál

- Kremelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich)

#### 4.1.3 Činidlá

- Dragendorffovo činidlo (podľa Muniera) – zásobný roztok činidla vznikne zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1, skladovaný pri teplote 4 °C niekoľko mesiacov.

##### **Roztok (A) :**

Bazický dusičnan bismutitý	1,7 g
Kyselina vinná	20,0 g
Voda destilovaná	80,0 g

##### **Roztok (B) :**

Jodid draselný	16,0 g
Voda destilovaná	40,0 g

##### **Roztok určený k detekcii :**

Zásobný roztok	5 ml
Kyselina vinná	10,0 g
Voda destilovaná	50,0 g

#### 4.1.4 Prístroje

- Vákuová odparka Büchi Rotavapor R- 114 (Büchi Labortechnik AG, Švajčiarsko)

- Ultrazvukový vodný kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Nemecko)
- Plynový chromatograf s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, USA)
- Polarimeter P3000
- NMR Varian Iniova 500

#### 4.1.5 Mobilná fáza pre tenkovrstvovú chromatografiu

- S1 – To : Et<sub>2</sub>NH (95 : 5)
- S2 – To : Ac : NH<sub>3</sub> (65 : 35 : 2)
- S3 – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O : TFFA (85 : 18 : 2 : 0,1)
- S4 – To : cHx : Et<sub>2</sub>NH (70 : 25 : 5)
- S5 – Ac : cHx : To : NH<sub>3</sub> (35 : 30 : 30 : 2)
- S6 – cHx : To : Et<sub>2</sub>NH (60 : 40 : 5)

#### 4.1.6 Chromatografický adsorpčný materiál

- Nalievané dosky so silikagelom (Kieselgel 60 GF254) o rozmere 150 x 150 mm
- Komerčné chromatografické dosky 20 x 20 cm, hrubé 0,2 mm, potiahnutý Silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck)

#### 4.1.7 Rastlinný materiál

Cibule rastliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master zakúpené od firmy Lukon Glands (ČR). Verifikáciu vykonal Prof. RNDr. L. Opletal, Csc. Dokladové vzorky sú uchovávané na Katedre farmaceutickej botaniky FAF UK.

### 4.2 Metodické postupy

#### 4.2.1 Príprava rozpúšťadiel

Všetky komerčne používané rozpúšťadlá boli pred použitím prečistené destiláciou. Takto pripravené rozpúšťadlá boli následne uchovávané v tmavých sklenených širokohrdlých fľašiach, náležite označené a chránené pred svetlom.

#### 4.2.2 Odparovanie

Extrakty z alkaloidov, ktoré boli získané behom separácie a čistenia kremelinou za pomoci stĺpcovej chromatografie a rozpúšťadiel, boli odparené za pomoci vákuovej rotačnej odparky s vodným kúpeľom pri teplote 40 °C. Menšie objemy v ampulkách boli odparené pomocou vodného kúpeľa s teplotou 60 – 80 °C a celý proces bol urýchľovaný prúdom vzduchu.

Po nasledujúcich najmenej 24 hodín boli vzorky dosušované v exsikátore so silikagelom. Uchovávané boli pri teplote do 8 °C.

#### **4.2.3 Príprava nalievajúcich dosiek pre preparatívnu tenkovrstvovú chromatografiu**

Najmenej 24 hodín pred plánovanou TLC boli pripravené sklenené dosky s rozmermi 150 x 150 mm, na ktoré bola rovnomerne naliatá suspenzia 6,5 g silikagelu v 20,5 ml a nechali sa uschnúť. Povrch dosiek bol pred naliatím suspenzie očistený a odmastený chloroformom.

#### **4.2.4 Preparatívna TLC**

Alkaloidný extrakt bol rozpustený v zmesi  $\text{CHCl}_3$  : EtOH (1 : 1) a v tenkej línii nanosený na nalievajúce sklenené TLC dosky. Po odparení rozpúšťadla boli dosky vyvíjané metódou vzostupnej tenkovrstvovej chromatografie v uzatvorených komorách nasýtených parami MF.

#### **4.2.5 Detekcia na chromatografických doskách**

Na chromatografických doskách bola prítomnosť alkaloidov detekovaná pomocou UV lampy pri vlnovej dĺžke 254 a 366 nm a následným postrekom Dragendorffovým činidlom, ktorý reaguje s alkaloidmi za vzniku oranžových škvŕn.

#### **4.2.6 Stĺpcová chromatografia**

Kolóna pre stĺpcovú chromatografiu bola pripravená naliatím suspenzie silikagelu v mobilnej fáze. Extrakt bol nanosený na kolónu v podobe rozteru, kedy bol extrakt rozpustený v potrebnom množstve chloroformu a zmiešaný s adsorbentom v pomere 1 : 4. Chloroform bol následne odparený na vodnom kúpeli a zmes bola dosušená v exsikátore.

### **4.3 Izolácia alkaloidov**

Za prípravu a stĺpcovú chromatografiu sumárneho extraktu patrí poďakovanie PharmDr. Daniele Hulcovej Ph.D., ktorá ho uskutočnila v rámci vypracovania svojej dizertačnej práce. Úlohou tejto diplomovej práce bolo následné spracovanie pridelenej podfrakcie ND 3-5/7.

#### **4.3.1 Príprava sumárneho extraktu**

Pre prípravu sumárneho extraktu bolo celkom spracovaných viac než 27 kg čerstvých cibúľ rastliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master. Cibule boli rozomleté a 30 minút extrahované varom na vodnom kúpeli v EtOH 96%. Etanolový extrakt bol sfiltrovaný a odparený na vákuovej odparke. Celkom bolo získaných 450 g extraktu. Odparok bol

rozpustený v 1 L 2% HCl a následne doplnený destilovanou vodou na objem 5 L. Vzniklá suspenzia bola prefiltrovaná cez kremelinu a filtrát bol následne prečistený liquid-liquid extrakciou. Alkaloidný extrakt bol najprv vytrepávaný 3 x 1,5 L Et<sub>2</sub>O. Následne bol vodný výtrepok alkalizovaný 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 10 a extrahovaný do EtOAc 3 x 1,5 L. Odparením ethylacetátových výtrepkov vzniklo 95 g sumárneho extraktu. Tento extrakt bol následne rozpustený v 500 ml 2% HCl a extrahovaný za použitia Et<sub>2</sub>O 3 x 300 ml. Vodné výtrepky boli alkalizované 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a extrahované do Et<sub>2</sub>O 4 x 350 ml.

Vo vodnej fáze bola preukázaná za využitia Mayerovho činidla prítomnosť zostatkového množstva alkaloidov a táto fáza bola následne ďalej pretrepávaná CHCl<sub>3</sub> 4 x 350 ml. Výtrepky získané pri extrakcii s Et<sub>2</sub>O a CHCl<sub>3</sub> boli odparené a následne spojené. Celkom bolo získaných 58,52 g sumárneho alkaloidného extraktu.

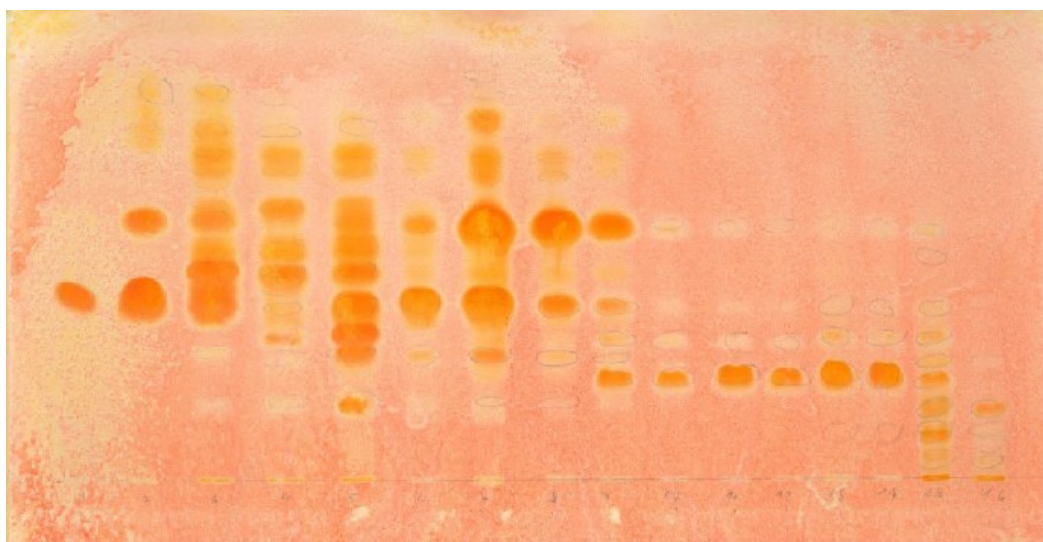
#### 4.3.2 Stĺpcová chromatografia

Vzniklý alkaloidný extrakt bol separovaný na jednotlivé frakcie pomocou stĺpcovej chromatografie (tab.4). Frakcie ďalej slúžili k izolácii čistých alkaloidov.

**Tabuľka 4** - Podmienky stĺpcovej chromatografie

Odparok	58,52 g
Adsorbent na rozter	240 g
Adsorbent	2500 g, neutrálny Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> deaktivovaný 6% H <sub>2</sub> O s rozmermi zrn 40 – 200 μm (ACROSS)
Priemer kolóny	7,1 cm
Výška kolóny	62 cm
Mŕtvy objem	2300 ml
Prietok	250 ml / hod
Mobilné fáze	CHCl <sub>3</sub> : LB v rôznych pomeroch(3 : 7, 2 : 3, 1 : 1, 11 : 9, 3 : 2, 13 : 7, 3 : 1, 4 : 1, 17 : 3 a 9 : 1), CHCl <sub>3</sub> , CHCl <sub>3</sub> : EtOH (1 : 1)

Celkovo bolo získaných 310 frakcií, ktoré boli priebežne sledované za využitia kontrolných TLC. Frakcie, ktoré obsahovali alkaloidy s rovnakým retenčným faktorom (R<sub>f</sub>), boli spojené a v konečnom dôsledku bolo získaných 16 frakcií. Zloženie jednotlivých frakcií bolo monitorované za pomoci TLC s detekciou Dragendorffovým činidlom. (Obrázok 15)



**Obrázok 15** - Súhrnná TLC spojených frakcií z alkaloidného extraktu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (adsorbent SiO<sub>2</sub> F 254, mobilná fáza S1, dráha 8,5cm, 1x vyvíjané, detakcia- Dragendorffovo činidlo)

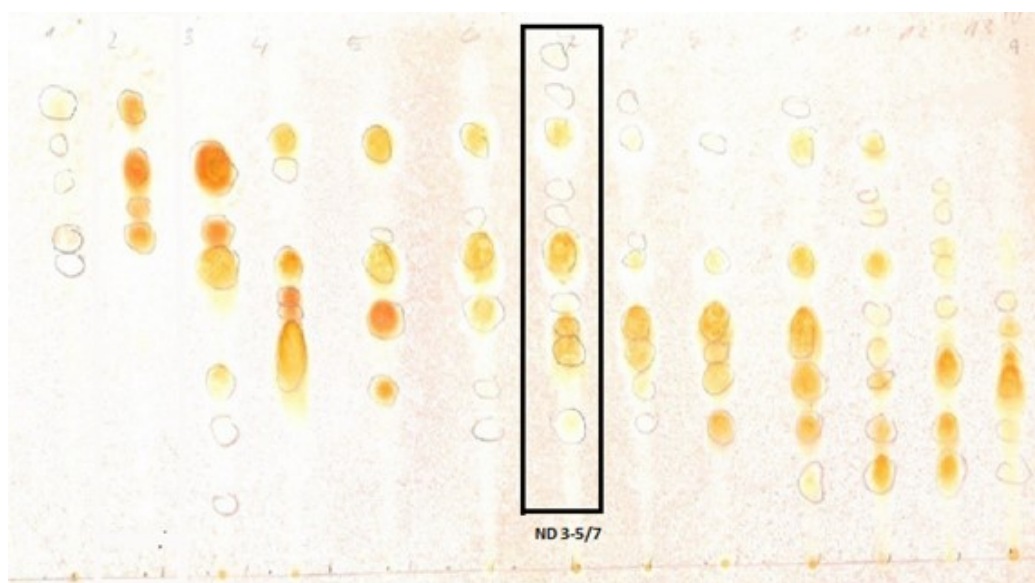
Podobné spojené frakcie boli opäť zlúčené a vzniklo 11 frakcií. Výsledky stĺpcovej chromatografie s použitými MF a získanými hmotnosťami sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

**Tabuľka 5** - Alkaloidné frakcie získané zo stĺpcovej chromatografie

Frakcia	Spojené frakcie	Mobilná fáza	Výťažok (g)
ND 1	46-51	CHCl <sub>3</sub> : LB (40 : 60)	0,40
ND 2	51-57	CHCl <sub>3</sub> : LB (50 : 50)	11,1
ND 3	58-82	CHCl <sub>3</sub> : LB (50 : 50)	9,38
ND 4	83-94	CHCl <sub>3</sub> : LB (50 : 50)	2,48
ND 5	95-138	CHCl <sub>3</sub> : LB (55 : 45)	7,84
ND 6	139-165	CHCl <sub>3</sub> : LB (55 : 45)	3,21
ND 7	166-194	CHCl <sub>3</sub> : LB (55 : 45)	4,82
ND 9	195-206	CHCl <sub>3</sub> : LB (40 : 60)	1,10
ND 11	207-289	CHCl <sub>3</sub> : LB (35 : 65)	14,93
ND 15	290-292	CHCl <sub>3</sub> : LB (25 : 75) (20 : 80), (15 : 85), (10 : 90) CHCl <sub>3</sub> (100)	7,24
ND 16	293-301	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (1 : 1)	1,68
<b>Celkom</b>			<b>54,23</b>



Kontrolnou TLC bolo poukázané na veľkú podobnosť frakcií ND 3 – ND 5, následkom čoho bolo ich spojenie. Spojením bolo získaných asi 18 g extraktu. Kvôli veľkej hmotnosti bola táto frakcia podrobená opakovanej stĺpcovej chromatografii PharmDr. Danielou Hulcovou Ph.D. Extrakt bol nanesený na kolónu obvyklým spôsobom vo forme rozteru. Použitá bola kolóna s dĺžkou 100 cm a priemerom 5,8 cm, ktorá mala mŕtvy objem 2,18 L. MF boli  $\text{CHCl}_3$  : LB (1 : 1, 3 : 2, 75 : 40), samotný  $\text{CHCl}_3$ , zmes  $\text{CHCl}_3$  : EtOH (17 : 3, 3 : 1) a samotný EtOH. Týmto postupom bolo získaných 13 frakcií (obr.16). V rámci tejto práce bola spracovávaná frakcia ND 3-5/7.



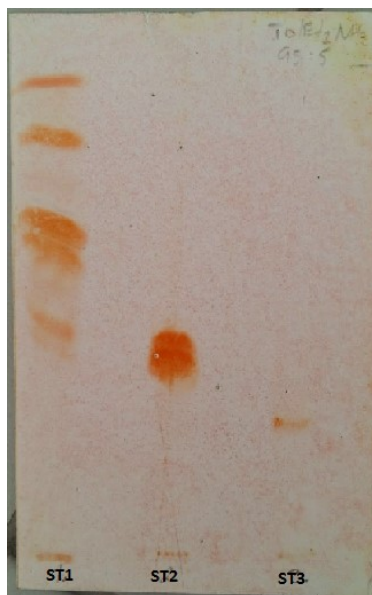
**Obrázok 16** - Súhrnná TLC spojených frakcií ND 3-5 (adsorbent  $\text{SiO}_2$  F 254, mobilná fáza S1, dráha 8,5cm, 1x vyvíjané, detakcia-Dragendorffovo činidlo)

#### 4.3.3 Spracovanie podfrakcie ND 3-5/7 (1,1023 g)

Pred samotnými separačnými činnosťami bola podfrakcia zmonitorovaná GC-MS analýzou. Výsledok poukázal na prítomnosť niekoľkých alkaloidov, ktorých štruktúra bola predbežne určená za pomoci databázy NIST.

Na začiatku experimentálnej práce bola vybraná vhodná MF pre najlepšiu separáciu jednotlivých alkaloidov. Výber bol uskutočnený na základe kontrolných TLC vyvíjaných v rôznych MF. Ako najvhodnejšia sa ukázala MF S1. Nasledovala vlastná preparatívna separácia na nalievajúcich sklenných doskách pre TLC s rozmermi 15 x 15 cm. Extrakt bol vo forme roztoku nanesený na 33 dosiek v tenkej línii. Dosky boli vyvíjané v nasýtených komorách 2x. Po vybratí boli dosky vysušené a alkaloidy detekované spôsobom popísaným vyššie. Pre separáciu boli vybrané 3 zóny, označené ako ST1-3. Zóny s rovnakým  $R_f$  z jednotlivých dosiek boli spojené a eluované potrebným množstvom zmesi EtOH :  $\text{CHCl}_3$

v pomere (1 : 1), odparené a uchovávané v chladničke. Získané podfrakcie boli ďalej spracovávané.



**Obrázok 17** - Kontrolná TLC oddelených fáz ST1, ST2, ST3

#### **4.3.3.1 Separácia alkaloidov z podfrakcie ST1**

Podfrakcia ST1 s hmotnosťou 0,57 g bola spracovaná preparatívnou TLC za použitia MF S6 a 16tich sklenených nalievajúcich dosiek so silikagelom. Dosky boli vyvíjané 2x v nasýtenej komore. Následne boli usušené a jednotlivé alkaloidné zóny zoseparované. Zóny s rovnakým  $R_f$  boli z jednotlivých dosiek spojené a eluované v zmesi  $\text{CHCl}_3$  : EtOH (1 : 1). Boli získané 4 zóny, ST1 A-D a pre ďalšiu prácu bola použitá zóna ST1D s hmotnosťou 232 mg. Ďalšia separácia prebiehala opäť na 8 nalievajúcich doskách, za použitia S5 ako mobilnej fázy. Po separácii 3 zón elúciou, odparením a rekryštalizáciou dvoch z nich, boli získané 2 látky v čistej forme ST1D2 o hmotnosti 27 mg a ST1D3 s hmotnosťou 5 mg.

#### **4.3.3.2 Separácia alkaloidov z podfrakcie ST2**

Frakcia ST2 bola získaná v množstve 0,35 g. Na kontrolnom chromatograme boli detekované 3 látky alkaloidnej povahy. Najprv bola vybraná najvhodnejšia MF (S2) pre separáciu týchto látok. Separácia opäť prebiehala na nalievajúcich sklenených doskách. Extrakt bol nanosený na 10 dosiek, ktoré boli v MF vyvíjané 3x, vysušené a nakoniec bola vykonaná detekcia. Separované boli 4 zóny ST2 A-D. Látky zo zón ST2 C a D boli vyzoloované len vo veľmi malom množstve a preto neboli ďalej spracovávané. Látka zo zóny A bola prekryštalizovaná zo zmesi  $\text{CHCl}_3$  : EtOH a bolo získaných 97 mg kryštálov. Látka zo zóny B bolo nutné prečistiť opakovanou TLC, pre ktorú bola vybraná MF S3. Boli použité 2 nalievajúce dosky a vyvíjanie

bolo vykonané 2x. Po separácii alkaloidnej zóny, eluovaní, odparovaní a následnej rekryštalizácii bolo získaných 30 mg čistej látky.

#### 4.3.3.3 Separácia alkaloidov z podfrakcie ST3

Podfrakcia ST3 o hmotnosti 62 mg bola v roztoku nanosená na 3 komerčné dosky pre TLC s rozmermi 20 x 10 cm. Pre separáciu bola použitá MF S4 a dosky boli vyvíjané 2x. Separované boli 3 zóny. Zóny A a B boli získané len vo veľmi malých množstvách, s ktorými sa ďalej nepracovalo. Zo zóny ST3C bol izolovaný jeden alkaloid s hmotnosťou 29 mg, ktorý bol však málo stabilný a musel byť uchovávaný v mrazničke.

**Tabuľka 6** - Zhrnutie výsledkov experimentálnej práce

Podfrakcia	Množstvo čistej látky (mg)	Použitá mobilná fáza
ST1D2	27	S5
ST1D3	5	S4
ST2A	97	S2
ST2B1	30	S3
ST3C	29	S4

## 4.4 Testovanie inhibičnej aktivity získaných alkaloidov proti cholinesterázam

### 4.4.1 Chemikálie

- acetyltiocholín jodid (Sigma-Aldrich) (použitý 10mM roztok)
- butyryltiocholín jodid (Sigma-Aldrich) (použitý 10mM roztok)
- 5,5' -ditiobis-2nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich) (použitý 5mM roztok)
- dimetylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- galantamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- huperzin A 95% (TAZHONGHUI) (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- 5mM fosfátový pufoer pH 7,4
- 5mM fosfátový pufoer pH 7,4 obsahujúci 150 mM chloridu sodného
- 100mM fosfátový pufoer pH 7,4

### 4.4.2 Prístroje

- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

#### 4.4.3 Podmienky merania

Podmienky:

- teplota 37 °C
- prostredie fosfátového pufru (pH 7,4)
- spektrofotometrické meranie farebných produktov pri vlnovej dĺžke 436 nm (AChE) a 412 nm (BuChE)

#### 4.4.4 Získanie erytrocytárnej AChE a BuChE z plazmy

Ako zdroj AChE bol použitý hemolyzát ľudských erytrocytov a ľudská plazma slúžila ako zdroj BuChE. Erytrocyty boli získané z čerstvo odobranej krvi zdravých dobrovoľníkov, ku ktorej bol pridaný citrát sodný ako činidlo proti zrážaniu krvi. Okamžite po odbere bola krv rovnomerne rozdelená do skúmaviek po 5 ml a bola odstredená centrifugáciou s rýchlosťou 4000 rpm pri teplote 4 °C po dobu 10 minút. Po skončení centrifugácie bola plazma zo skúmaviek odobraná bez erytrocytov a následne bola uchovaná pri teplote 4 °C do doby stanovenia BuChE aktivity. Zbytok plazmy bol pomocou bezpopolového filtru odstránený a po zmeraní objemu erytrocytárnej masy bolo k sedimentu pridané také množstvo 5mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujúceho 150 mM chloridu sodného, ktorým bol dosiahnutý objem suspenzie 13 ml. Následne bola vykonaná centrifugácia spôsobom popísaným vyššie. V ďalšom kroku bolo vykonané trojnásobné premytie, dokonalé odstránenie premývacej kvapaliny a následne bolo pridané potrebné množstvo fosfátového pufru 5mM pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, ktorý bol potrebný pre dosiahnutie pomeru erytrocyty : pufo 1 : 9. Takto vytvorená zmes bola zhomogenizovaná, preliata do Erlenmayerovej banky a ponechaná spontánnej hemolýze za neustáleho miešania teflónovým miešadlom s rýchlosťou 300 ot./min. Ihneď po skončení hemolýzy bola stanovená cholínesterázová aktivita suspenzie, prípadne sa hodnota absorbanie upravila 5mM fosfátovým pufrom (rozmedzie absorbanie pre AChE = 0,08 – 0,15 a BuChE = 0,15 – 0,20). Hemolyzát bol uchovávaný do doby použitia pri teplote -22 °C.

#### 4.4.5 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti AChE a BuChE

Pre stanovenie hodnoty inhibičnej aktivity ( $IC_{50}$ ) bola použitá Ellmanova spektrofotometrická metóda za použitia 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB).

Pri meraní aktivity enzýmov bolo do jamiek mikrotitračných dosťičiek napipetovaných 8,3  $\mu$ l plazmy alebo hemolyzátu, 283  $\mu$ l 5mM DTNB a 8,3  $\mu$ l DMSO. Po 2 minútovom

premiešani bola zmes inkubovaná v komore Reader Synergy™ pri teplote 37 °C po dobu 5 minút. Ďalej bolo pridaných 33,3 µl roztoku substrátu (10mM acetyltiocholín jodid / 10mM butyryltiocholín jodid), po 2 minútach bola pri príslušnej vlnovej dĺžke (dĺžke  $\lambda = 436$  nm (AChE) a  $\lambda = 412$  nm (BuChE)) zmeraná absorbanca žltého produktu, ktorý vznikol naviazaním SH-skupiny z tiocholínu na DTBN. Pri experimente bol sledovaný nárast absorbanacie za 1 minútu.

Pri stanovovaní aktivity látok bolo postupované obdobným spôsobom za využitia rovnakých objemov činidiel a roztoku substrátu, ale namiesto samotného DMSO, ktorý sa použil len do jamiek s porovnávacím roztokom, boli pridávané roztoky meranej látky v DMSO v koncentráciách 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM.

Z nameraných hodnôt poklesu aktivity AChE a BuChE bola vypočítaná nelineárnou regresiou hodnota  $IC_{50}$  v µM, za využitia programu GraphPad Prism (verzia 5.02 pre Windows, Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Táto hodnota bola následne porovnaná s hodnotami  $IC_{50}$  referenčných látok: galantaminom a huperzinom A. Inhibícia v % bola prepočítaná pomocou vzorca:  $I = 100 - [ (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100 ]$ , kde  $\Delta A_{BL}$  je nárast absorbanacie slepej vzorky za 1 minútu a  $\Delta A_{SA}$  je nárast absorbanacie meranej vzorky.

## **4.5 Testovanie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti POP**

### **4.5.1 Chemikálie**

- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich)
- prolyloligopeptidáza (POP) (Sigma-Aldrich)
- Bajkalin (Sigma-Aldrich)
- Z-Pro-prolinal (Sigma-Aldrich)
- dimetylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- 1,4-dioxan (Lachema)
- 0,01M fosfátový pufoer pH 7,4 (zloženie: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl)

### **4.5.2 Prístroje**

- ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

### **4.5.3 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti POP**

POP bola rozpustená v 0,01M fosfátovom pufoeri. Jej špecifická aktivita bola 0,2 U/ml. Zásobné roztoky boli pripravené za použitia 10mM DMSO. Zriedením zásobných roztokov deionizovanou vodou boli získané jednotlivé koncentrácie testovaných vzoriek. Kontrolná

vzorka obsahovala rovnakú koncentráciu DMSO. Substrátom POP bol Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, ktorý bol rozpustený v 50% 1,4-dioxane (5mM). Skúšané roztoky boli pripravené zmiešaním 170 µl pufru, 5 µl testovanej látky a 5 µl roztoku POP. Zmes bola následne inkubovaná po dobu 5 minút pri teplote 37 °C, ďalej k nej bolo pridaných 20 µl substrátu a zmes bola v mikrotitračných dosičkách inkubovaná ďalších 30 minút pri 37 °C. Množstvo vzniknutého farebného produktu, *p*-nitroanilidu (merané pri vlnovej dĺžke 405 nm), bolo priamo závislé od aktivity POP.

Inhibičná aktivita testovaných látok bola vyjadrená ako hodnota IC<sub>50</sub>. Získané hodnoty boli spracované v programe GraphPad Prism a porovnané s referenčnými látkami bajkalinom a Z-Pro-prolinalom.

## 4.6 Testovanie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti GSK-3β

### 4.6.1 Chemikálie

- dimetylsulfoxid p.a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- SB-415286 (Selleck Chemicals)
- GSM (Merc Millipore)
- GSK3-β (Merc Millipore)
- adenzín 5-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich)
- súprava činidiel Kinase-Glo (Promega)
- pufor pH 7,5 (zloženie: 50 mM 4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-etansulfónovej kyseliny (HEPES), 1 mM tetrasodnej soli etylén glykol-bis(-aminoetyléter)-N,N,N,N-tetraoctovej kyseliny (EGTA), 1 mM etyléndiamintetraoctovej kyseliny (EDTA) a 15 mM octanu horečnatého) (Sigma-Aldrich)

### 4.6.2 Prístroje

- Reader Victor X3

### 4.6.3 Stanovenie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov proti GSK-3β

Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov proti GSK-3β bolo študované na základe luminescenčnej metódy podľa Baki et al., s využitím súpravy činidiel Kinase-Glo. Reakcia bola uskutočnená na 96 jamkovej mikrotitračnej dosičke. Každá jamka obsahovala 10 µl skúšanej látky rozpustenej v DMSO v koncentrácii 1 mM a zriedenej pufrom s pH 7,5 na požadovanú koncentráciu. Ďalej bolo pridaných 10 µL adenzín 5-trifosfátu (ATP), 10 µL 100mM GSM (substrát pre GSK-3β) a 10 µL GSK3-β. Pozitívna kontrola bola vykonaná za použitia 10 µL

pufry a jamky negatívnej kontroly obsahovali 10  $\mu$ L SB-415286, štandard pre inhibíciu GSK-3 $\beta$ . Konečná koncentrácia DMSO v zmesi nesmie prekročiť 5 %.

Zmes bola pri teplote 37 °C 30 minút inkubovaná a následne bola enzymatická reakcia zastavená pridaním 40  $\mu$ L Kinase-Glo. Po 10 minútach bola odočítaná luminescencia. Aktivita bola úmerná rozdielu celkovej a spotrebovanej ATP. Inhibičná aktivita bola vypočítaná na základe maximálnej aktivity, ktorá bola zameraná pri neprítomnosti inhibítora a maximálna inhibícia bola zameraná v prítomnosti referenčnej látky. Hodnota IC<sub>50</sub> bola vypočítaná za využitia programu GraphPad Prism. Získané hodnoty inhibičnej aktivity skúšaných látok boli porovnané s IC<sub>50</sub> štandardu SB-415286 (IC<sub>50</sub> = 70,00 nM).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Identifikácia izolovaných alkaloidov

Identifikácia izolovaných látok bola vykonaná na základe ich fyzikálne-chemických vlastností za pomoci rôznych spektrálnych metód (NMR, GC-MS, ESI a optická otáčavosť) a porovnaním získaných dát s literatúrou.

V rámci tejto práce bolo z podfrakcie ND3-5/7 celkom izolovaných 5 látok alkaloidnej povahy v čistom stave, ktoré boli identifikované ako karanin, *O*-etyllykorenin, narwedín, pluviín a *N*-demetylhomolykorin.

#### 5.1.1 GC-MS analýza

Identifikácia získaných alkaloidov a meranie ich hmotnostných spektier bolo uskutočnené plynovým chromatografom s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 7890 A GC59 inert MSD, ktorý pracuje v režime elektrónovej ionizácie 70 eV. Počas separácie bola používaná kolóna DP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, Agilent Technologies Santa Clara, California, USA). K zvýšeniu počiatočnej teploty zo 100 °C na teplotu 180 °C dochádzalo rýchlosťou 15 °C/min. Teplota bola udržiavaná 1 minútu, následne ďalej stúpala po 5 °C/min až na teplotu 300 °C, ktorá bola udržiavaná 40 minút. Rýchlosť prietoku He využívaného ako nosný plyn bola 0,8 ml/min. Injektor nastavený na 280 °C bol použitý na nastreknutie vzorky (1mg/ml) s objemom 1  $\mu$ l v „split mode“ pri pomere 1 : 10. Teplota detektoru bola 200 °C a jeho detekčné rozmedzie bolo *m/z* 35 - 600. K identifikácii alkaloidov bolo používané porovnávanie ich MS spektier so spektrami z knižnice NIST, so spektrami uvádzanými v literatúre a s ďalšími spektrami látok, ktoré boli izolované na Katedre farmaceutickej botaniky UK v Hradci Králové.

#### 5.1.2 Hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom

MS (ESI) spektrá boli merané pre zistenie molekulovej hmotnosti niektorých látok. Spektrá boli získané za využitia spektrometra LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizáciou elektrosprejom v kladnom móde. Ako analyzátor bola použitá iontová past. MSn bola vykonaná pri kolíznej energii 40 eV. Alkaloidný roztok v MeOH (1 mg / ml) bol aplikovaný priamo na sondu.

#### 5.1.2 Nukleárna magnetická rezonancia

NMR spektrá boli namerané na prístroji Varian Iniova 500. Pracovná frekvencia bola 499,9 MHz pre  $^1\text{H}$  a 125,7 MHz pre  $^{13}\text{C}$ . Meranie bolo uskutočnené pri 25 °C



v deuteriochloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ). Spektrá  $^1\text{H}$  boli merané pomocou inverznej 5 mm ID PGF sondy za použitia štandardných pulzných frekvencií a na meranie  $^{13}\text{C}$  spektier boli využité 5 mm SW širokopásmové sondy.

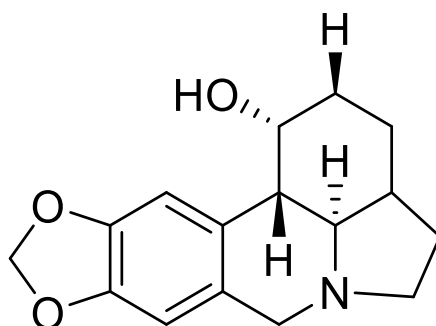
### 5.1.3 Optická otáčavosť

Optická otáčavosť bola meraná na polarimetre P3000 v prostredí metanolu (1 mg/ml) a pri teplote 25 °C.

## 5.2 Určenie štruktúry ST1D2

Látka bola za využitia NMR analýzy identifikovaná ako (-) karanin.

Nameraná optická otáčavosť bola  $[\alpha]_{25}^D = (-) 220,0$ .



Obrázok 18 - Karanin

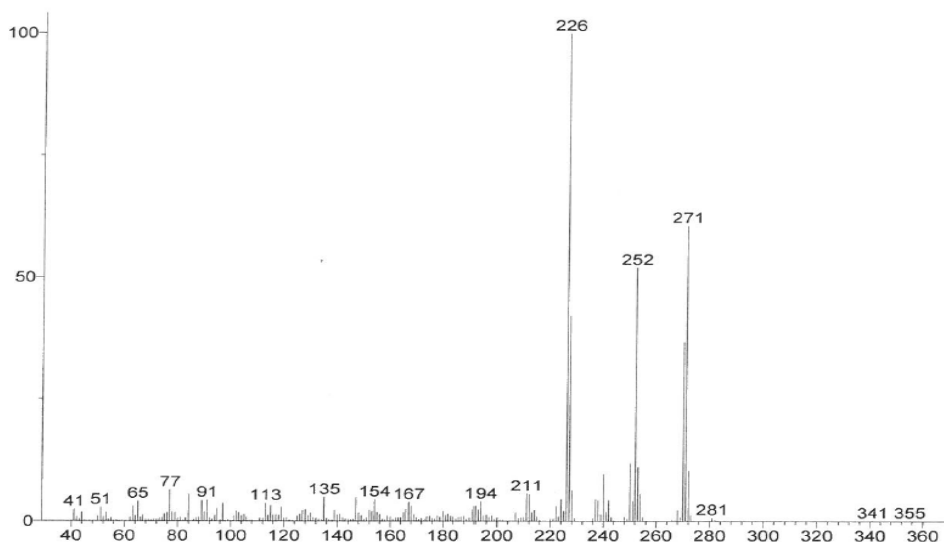
### 5.2.1 NMR analýza

$^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.84 (1H, s), 6.60 (1H, s), 5.96–5.92 (2H, m), 5.44–5.40 (1H, m), 4.73 (1H, bs), 4.15 (1H, d,  $J = 14.1$  Hz), 3.51 (1H, d,  $J = 14.1$  Hz), 3.37–3.31 (1H, m), 2.82–2.76 (1H, m), 2.68–2.54 (4H, m), 2.46–2.38 (1H, m), 2.34 (1H, dd,  $J = 17.6$  Hz,  $J = 8.8$  Hz), 1.66 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz).

$^{13}\text{C NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 146.6, 146.2, 139.0, 130.5, 127.8, 114.5, 107.8, 104.6, 100.9, 64.9, 60.8, 57.2, 53.8, 45.1, 35.3, 28.6.

### 5.2.2 GC-MS analýza

EI-MZ ( $m/z$ ) 272(10), 271(60), 270(37), 253(11), 252(52), 250(12), 240(10), 227(42), 226(100), 77(6)

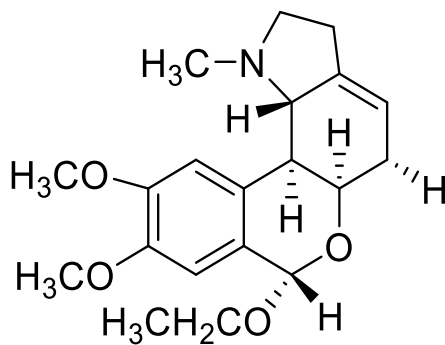


Obrázok 19 - GC-MS spektrum karanin

### 5.3 Určenie štruktúry ST1D3

Látka bola identifikovaná ako (+) *O*-etyllykorenin. Identifikácia bola uskutočnená za pomoci NMR analýzy.<sup>126</sup>

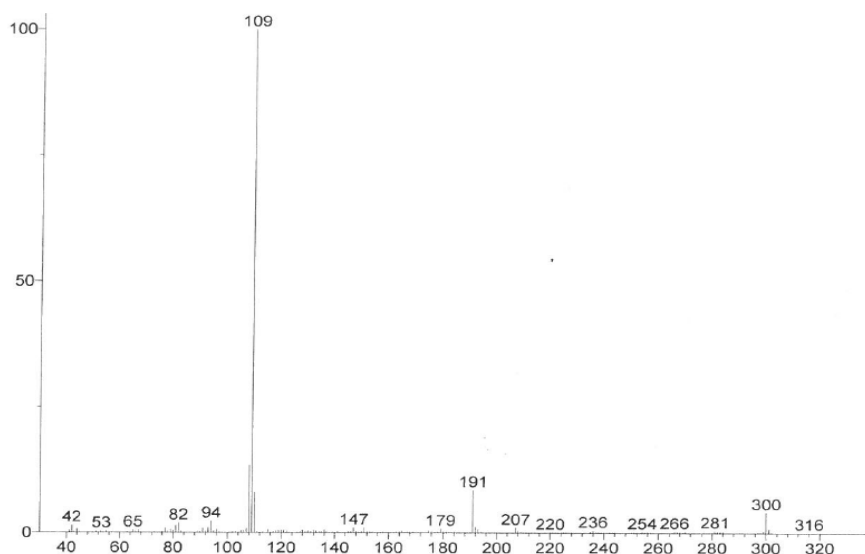
Nameraná optická otáčavosť bola  $[\alpha]_{25}^D = (+) 178,0$ .



Obrázok 20 - *O*-etyllykorenin

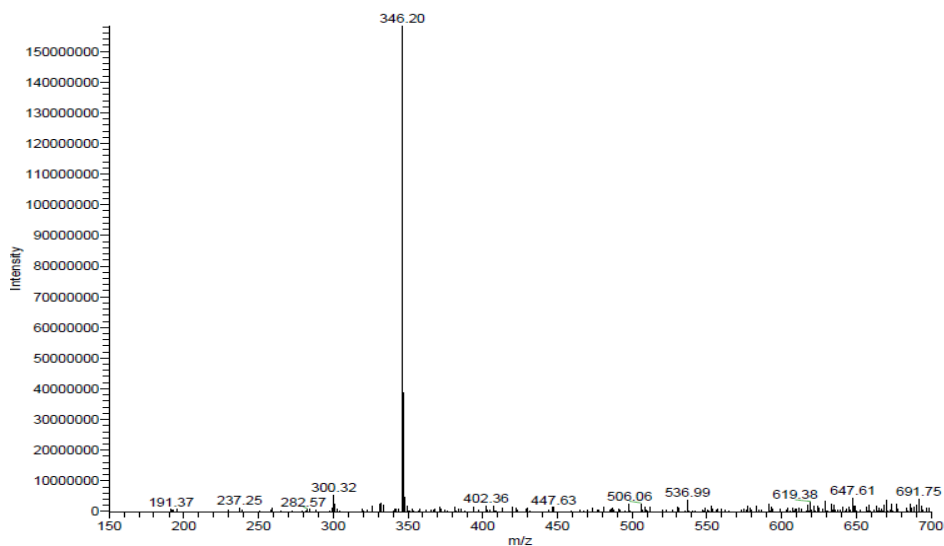
#### 5.3.1 GC-MS analýza

EI-MZ (*m/z*) 300(4), 192(1), 191(8), 110(8), 109(100), 108(13), 94(2), 82(2), 91(1), 42(1)



Obrázok 21 - GC-MS spektrum *O*-etyllykorenin

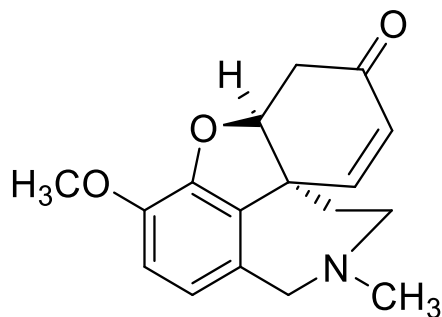
### 5.3.2 ESI-MS analýza



Obrázok 22 - ESI-MS spektrum *O*-etyllykorenin

### 5.4 Určenie štruktúry ST2A

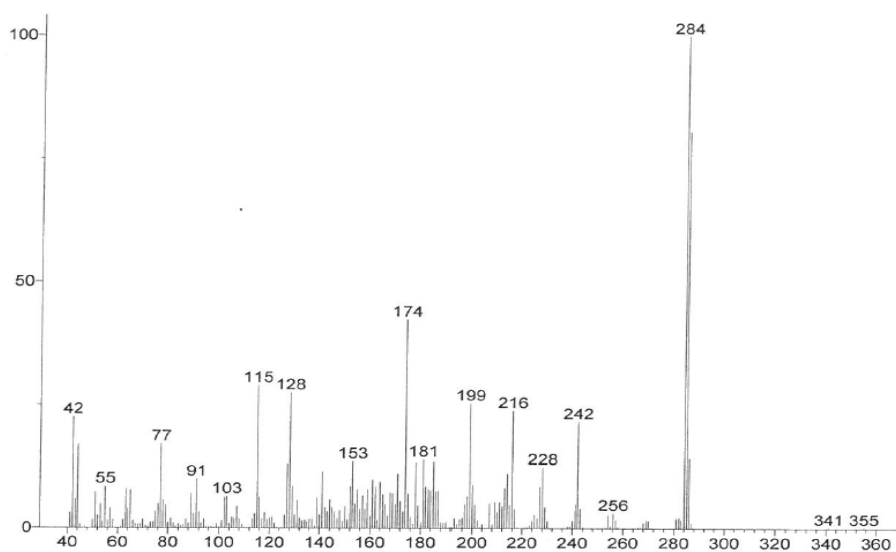
Látka bola identifikovaná ako (+) narwedín. Identifikácia bola uskutočnená za pomoci NMR analýzy.<sup>127</sup> Nameraná optická otáčavosť bola  $[\alpha]_{25}^D = (+) 128,0$ .



Obrázok 23 - Narwedín

### 5.4.1 GC-MS analýza

EI-MZ (m/z) 285(80), 284(100), 242(21), 216(24), 199(25), 174(42), 128(27), 115(29), 77(17), 42(22)

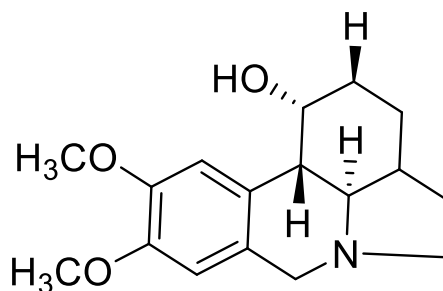


Obrázok 24 - GC-MS spektrum narwedín

### 5.5 Určenie štruktúry ST2B1

Látka bola identifikovaná ako (-) pluviín. Identifikácia bola uskutočnená za pomoci NMR analýzy.<sup>128</sup>

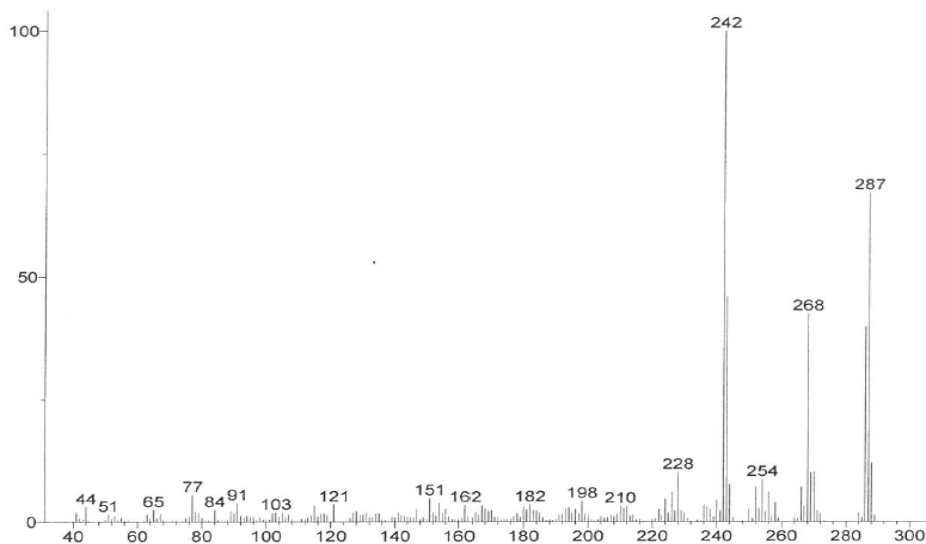
Nameraná optická otáčavosť bola  $[\alpha]_{25}^D = (-) 180,0$



Obrázok 25 - Pluviín

### 5.5.1 GC-MS analýza

EI-MZ (m/z) 288(12), 287(67), 286(40), 270(10), 269(10), 268(42), 254(9), 243(46), 242(100), 228(10)

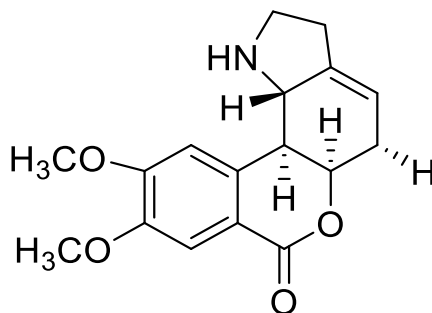


Obrázok 26 - GC-MS spektrum pluvíin

### 5.6 Určenie štruktúry ST3C

Látka bola identifikovaná ako (+) *N*-demetylmolykorin. Identifikácia bola uskutočnená za pomoci NMR analýzy.<sup>129</sup>

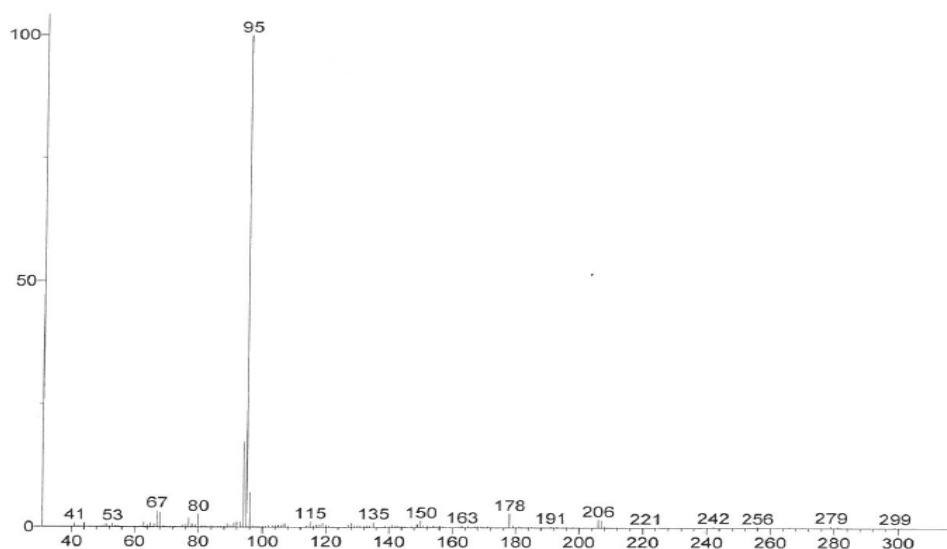
Nameraná optická otáčavosť bola  $[\alpha]_{25}^D = (+) 12,0$



Obrázok 27 - *N*-demetylmolykorin

### 5.6.1 GC-MS analýza

EI-MZ (m/z) 207(1), 206(2), 178(3), 96(7), 95(100), 94 (17), 80(3), 77(2), 68(3), 67(3)



Obrázok 28 - GC-MS spektrum *N*-demetylhomolykorin

## 5.7 Biologická aktivita izolovaných alkaloidov využiteľná v liečbe Alzheimerovej choroby

Výsledky *in vitro* testovania získaných alkaloidov na ich inhibičnú aktivitu proti cholinesterázam, prolololigopeptidáze a GSK-3 $\beta$  sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 7 - Inhibičná aktivita alkaloidov proti AChE, BuChE, POP a GSK-3 $\beta$

Testované zlúčeniny	AChE IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	BuChE IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	POP IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	GSK-3 $\beta$ IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Karanin	321 $\pm$ 42	487 $\pm$ 55	> 500	<b>30,8 <math>\pm</math> 0,3</b>
<i>O</i> -etylykorenin	> 500	> 500	> 500	n.
Narwedín	281 $\pm$ 34	911 $\pm$ 69	907 $\pm$ 87	n.
Pluviín	> 500	> 500	> 500	n.
<i>N</i> -demetylhomolykorin	> 500	> 500	> 500	n.
ŠTANDARDY				
Huperzín A	0,033 $\pm$ 0,001	> 500	n.	n.
Berberín	n.	142 $\pm$ 21	n.	n.
Z-Pro-prolinal	n.	n.	2,75 Nm	n.
SB-415286	n.	n.	n.	70 M

## 6. DISKUSIA

Čeľad Amaryllidaceae je predmetom výskumu už veľa rokov. Hlavným dôvodom je obsah farmakologicky významných sekundárnych metabolitov, ktoré sa nazývajú amarylkovité alkaloidy. Ako už bolo vyššie spomenuté, u týchto alkaloidov bolo preukázaných viacero biologických aktivít ako antibakteriálne, antivírové a antimalarické pôsobenie, a taktiež niektoré alkaloidy preukázali významnú biologickú aktivitu hlavne v oblasti protinádorovej liečby a liečby Alzheimerovej choroby. Táto práca bola venovaná amarylkovitým alkaloidom, ktoré sú predovšetkým prítomné v rode *Narcissus*.

V rámci experimentálnej časti sa z podfrakcie alkaloidného extraktu, ktorý bol získaný spracovaním cibúľ rastliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master, podarilo vyizolovať 5 amarylkovitých alkaloidov, ktoré boli za využitia fyzikálno-chemických metód identifikované ako karanin, *O*-etyllykorenin, narwedín, pluviín a *N*-demetylhomolykorín. Získané alkaloidy patria do galantaminového, lykorinového a homolykorinového štruktúrneho typu. Tieto alkaloidy už boli v minulosti z rodu *Narcissus* získané (karanin - *Narcissus* cv. Livia, Ice Follies, narwedín – *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Carlton, *Narcissus tazetta* L., pluviín – *Narcissus poeticus* L., *Narcissus pseudonarcissus* spp., *Narcissus cyclamineus* cv. Peepin Tom, *O*-etyllykorenin – *Narcissus pseudonarcissus* spp.)<sup>3</sup> a z rodu *Lycoris* (*N*-demetylhomolykorín – *Lycoris radiata* L.)<sup>129</sup>. *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master bol vybraný pre testovanie na základe screeningu z minulých rokov vykonaných na Katedre farmaceutickej botaniky.

V rámci diplomovej práce boli alkaloidy získané v dostatočnom množstve a podrobené viacerým biologickým testom, ktoré boli zamerané na stanovenie ich potenciálneho využitia v liečbe Alzheimerovej choroby ako inhibítory AChE, BuChE, GSK-3 $\beta$  a POP. Namerané hodnoty boli porovnané so štandardmi. Výsledky testov sú zhrnuté v tabuľke (tab.7). Zaujímavú inhibičnú aktivitu voči GSK-3 $\beta$  vykazoval karanin ( $IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu M$ ). Tieto údaje sa zhodujú s poznatkami, ktoré boli na pracovisku Farmaceutickej fakulty v minulosti popísané.<sup>130</sup> Jeho inhibičná aktivita proti cholínesterázam bola zanedbateľná ( $IC_{50AChE} = 321 \pm 42 \mu M$ ,  $IC_{50BuChE} = 487 \pm 55 \mu M$ ). Ostatné látky taktiež nevykazovali dostatočnú aktivitu, ktorá by mohla byť využiteľná v terapii Alzheimerovej choroby. Aj napriek tomu, že samotný narwedín je z pohľadu cholínesterázovej inhibičnej aktivity veľmi málo významný ( $IC_{50AChE} = 281 \pm 34 \mu M$ ), sú v literatúre popísané metódy prípravy galantaminu z tohto alkaloidu.<sup>3,131</sup> Hodnoty získané v tejto práci sa zhodujú s informáciami

dostupnými v literatúre, kde sa spomína, že alkaloidy homolykorinového typu, kde sa zaraďujú *N*-demetylhomolykorin ( $IC_{50AChE, BuChE, POP} > 500 \mu M$ ) a *O*-etyllykorenin ( $IC_{50AChE, BuChE, POP} > 500 \mu M$ ), nedisponujú výraznou cholinesterázovou aktivitou.<sup>90</sup> U alkaloidu lykorinového typu, pluviínu, neboli preukázané žiadne potenciálne aktivity ( $IC_{50AChE, BuChE, POP} > 500 \mu M$ ). Všetky vyizolované alkaloidy boli neaktívne proti POP v porovnaní s použitým štandardom Z-Pro-prolinalom ( $IC_{50} = 2,75 \text{ Nm}$ ). Za zmienku stojí *O*-etyllykorenin, u ktorého screening zameraný na preukázanie 50% inhibičnej aktivity proti GSK-3 $\beta$  pri koncentrácii 50  $\mu M$  poskytol zaujímavý výsledok s hodnotou 58 %. V budúcnosti by určite bolo vhodné zmerať jeho hodnotu  $IC_{50}$ .<sup>130</sup>

V rámci teoretickej časti práce bola vykonaná literárna rešerš zameraná na terapeutický potenciál amarylkovitých alkaloidov so zameraním na ich inhibičnú aktivitu proti cholinesterázam a na ich protinádorové pôsobenie. Havelek et.al. vo svojej práci poukázal na významný protinádorový účinok viacerých alkaloidov čeľade Amaryllidaceae, ale zároveň sa v jeho práci spomína aj nedostatočný cytotoxický efekt narwedinu a mierny antiproliferatívny efekt karaninu na testované bunkové línie.<sup>124</sup>



## 7. ZÁVER

V rámci experimentálnej časti diplomovej práce sa podarilo za využitia preparatívnej tenkovrstvovej chromatografie a následnej kryštalizácie čistých látok, izolovať z pridelenej podfrakcie ND 3-5/7 celkom 5 látok alkaloidnej povahy. Následne boli identifikované za využitia GC-MS, NMR analýzy a optickej otáčavosti a získané údaje boli porovnávané s údajmi, ktoré boli dostupné v literatúre. Na základe týchto informácií sa alkaloidy určili ako karanin, *O*-etyllykorenin, narwedín, pluvín a *N*-demetylhomolykorenin. Alkaloidy, ktoré boli získané v dostatočnom množstve, boli podrobené skúškam na zmeranie ich biologickej aktivity. Konkrétne bola u nich sledovaná ich inhibičná aktivita namierená na AChE, BuChE, GSK-3 $\beta$  a POP. Z výsledkov vyplýva, že jedine karanin disponuje potenciálnou schopnosťou ovplyvniť aktivitu GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu M$ ). Tento výsledok poukazuje na možné využitie alkaloidu v prevencii rozvoja Alzheimerovej choroby. Ostatné vyizolované látky nepreukázali zaujímavú inhibičnú aktivitu proti testovaným enzýmom pri porovnaní so štandardmi.

## 8. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Sabina Tanková

Školiteľ: PharmDr. Daniela Hulcová, PhD.

Názov diplomovej práce: Alkaloidy rodu *Narcissus* a ich biologická aktivita

Kľúčové slová: *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master, Amaryllidaceae, alkaloidy, AChE, BuChE, POP, GSK-3 $\beta$ , biologická aktivita.

Alkaloidný extrakt získaný z cibúľ rastliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master extrakciou do etanolu, bol prečistený liquid-liquid extrakciou a frakcionizovaný pomocou stĺpcovej chromatografie na jednotlivé frakcie. Na konci bolo získaných 11 spojených frakcií, ktoré ďalej slúžili k izolácii čistých alkaloidov. Frakcia ND 3-5/7 bola spracovaná pomocou preparatívnej tenkovrstvovej chromatografie a následnou kryštalizáciou čistých látok. Z tejto frakcie bolo celkovo získaných 5 látok alkaloidnej povahy ST1D2, ST1D3, ST2A, ST2B1 a ST3C v rôznom množstve. Látky boli identifikované za využitia GC-MS analýzy, NMR analýzy a optickej otáčavosti. Následne boli získané údaje porovnávané so spektrami z knižnice NIST a s údajmi uvádzanými v literatúre. Získané alkaloidy boli identifikované ako karanin, *O*-etylylkorenin, narwedín, pluviín a *N*-demetylhomoalkaloid. Alkaloidy získané v dostatočnom množstve boli následne podrobené testom na stanovenie ich biologickej aktivity proti AChE, BuChE, GSK-3 $\beta$  a POP.

Inhibičná aktivita proti cholinesterázam bola stanovená *in vitro* spektrofotometrickou modifikovanou metódou podľa Ellmana. Inhibícia proti POP bola stanovená za využitia Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu ako substrátu. Stanovenie inhibičnej aktivity proti GSK-3 $\beta$  bola vykonaná *in vitro* luminescenčnou metódou podľa Baki et.al. (2007).

Väčšina izolovaných látok nevykazovala významnú inhibičnú aktivitu vo vykonaných biologických testoch pri porovnaní so štandardmi. Jediný zaujímavý výsledok bol inhibičný účinok karaninu proti GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu M$ ).

## 9. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Sabina Tanková

Supervisor: PharmDr. Daniela Hulcová, PhD.

Title of diploma thesis: Alkaloids of the genus *Narcissus* and their biological activity.

Key words: *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master, Amaryllidaceae, alkaloids, AChE, BuChE, POP, GSK-3 $\beta$ , biological activity.

Alkaloid extract obtained from bulbs of *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master was extracted by ethanol and was purified by liquid-liquid extraction and fractionated by column chromatography to individual fractions. At the end, were obtained 11 pooled fractions, which were used to isolate pure alkaloids. The ND 3-5 / 7 fraction was processed by preparative thin layer chromatography followed by crystallization of pure substances. In total, 5 alkaloid substances of ST1D2, ST1D3, ST2A, ST2B1 and ST3C were obtained from this fraction in various amounts. These substances were determined by GC-MS analysis, NMR analysis and optical rotation. Subsequently, the obtained data were compared with the NIST library spectra and the literature. Isolated substances have been identified as caranine, *O*-ethyllycorenine, narwedine, pluviine and *N*-demethylhomolycorine. The alkaloids obtained in sufficient amounts were subsequently subjected to tests to determine their biological activity against AChE, BuChE, GSK-3 $\beta$  and POP.

Cholinesterase inhibitory activity was determined *in vitro* by a modified Ellman spectrophotometric method. POP inhibition was determined using Z-Gly-Pro-p-nitroanilide as substrate. GSK-3 $\beta$  inhibitory activity was determined by using the *in vitro* luminescence method of Baki et al. (2007).

Most of the isolated substances did not show significant inhibitory activity in the bioassays performed compared to the standards.

The only interesting result was the inhibitory activity of caranine against GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu M$ ).

## 10. POUŽITÁ LITERATÚRA

- <sup>1</sup>Katiyar C., Gupta A., Kanjilal S., Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *Ayu.* 2012, 33, 10-19.
- <sup>2</sup>Hotchandani T., Penix I.D. Heterocyclic Amaryllidaceae alkaloids: Biosynthesis and Pharmacological applications. *Curr Top Med Chem.* 2017, 17, 418-427.
- <sup>3</sup>Hanks G.: *Narcissus and Daffodil: The genus Narcissus.* New Fatter Lane, London EC4P 4EE: Taylor and Francis, 2002. ISBN 0-415-27344-7.
- <sup>4</sup>Fürst R. Narciclasine – an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. *Planta Med.* 2016, 82, 1389-1394.
- <sup>5</sup>Heinrich M., Teoh H.L. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol.* 2004, 92, 147-162.
- <sup>6</sup>Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *J Nat Prod.* 2010, 73, 1223-1227.
- <sup>7</sup>Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny.* Praha 2009, Karolinum.
- <sup>8</sup>Jin Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2016, 33, 1318-1343.
- <sup>9</sup>Jin Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2013, 30, 849-868.
- <sup>10</sup>Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potencionální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy.* 2013, 107, 701-708.
- <sup>11</sup>Bastida J., Berkov S., Torras C.L., Pigni N.B., Andradre J.P.D., Martínez V., Viladomat M.F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences.* Elsevier Science. 2011, Chapter 3, 65-100.
- <sup>12</sup>Ding Y., Qu D., Zhang K.M., Cang X.X., Kou Z.N., Xiao W., Zhu J.B. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* 2017, 19, 53-100.
- <sup>13</sup>Kornienko A, Evidente A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem Rev.* 2008, 108, 1982-2014.
- <sup>14</sup>Louw C.A.M., Regnier T.J.C., Korsten L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in control infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 2002, 82, 147-154.
- <sup>15</sup>He M., Qu C., Gao O., Hu X., Hong X. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv.* 2015, 5, 16562–16574.
- <sup>16</sup>McNulty J., Nair J.J., Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry.* 2007, 68, 1068-1074
- <sup>17</sup>Graham S.W., Barrett S.C.H. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Am J Bot.* 2004, 91, 1007-1021.
- <sup>18</sup>Bryan J.E. *Kapesní atlas Cibuloviny.* Knižní klub, Praha 2010.
- <sup>19</sup>Wang J., Xu J., Xing G. Lycorine inhibits the growth and metastasis of breast cancer through the blockage of STAT3 signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2017, 49, 771-779.
- <sup>20</sup>Petrová E. *Pěstujeme okrasné cibuloviny.* Praha, Brázda, 2005. ISBN 80-209-03356.
- <sup>21</sup><http://hortuscamden.com/plants/print/narcissus-tazetta-l> (stiahnuté 2.3.2019)

- <sup>22</sup><http://hortuscamden.com/plants/view/narcissus-pseudo-narcissus-l> (stiahnuté 2.3.2019)
- <sup>23</sup>Cimmino A., Masi M., Evidente M., Superchi S., Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality*. 2017 29, 486-499
- <sup>24</sup>Li X., Lu M., Tang D., Shi Y. Composition of carotenoids and flavonoids in *Narcissus* cultivars and their relationship with flower color. *PLoS ONE*. 2015, 10, 1-14.
- <sup>25</sup>Fu K.L., Li X., Ye J., Lu L., Xu X.K., Li H.L., Zhang W.D., Shen Y.H. Chemical constituents of *Narcissus tazetta* var. *Chinensis* and their antioxidant activities. *Fitoterapia*. 2016, 113, 110-116.
- <sup>26</sup>Jones M., Pulman J., Walker T. Drugs from Daffodils. *Chem Ind*. 2011, 4, 18-20.
- <sup>27</sup><http://www.brightsidestl.org/donate/city-employees-online-store/> (stiahnuté 28.12.2018)
- <sup>28</sup><https://www.farmergracy.co.uk/products/narcissus-dutch-master-bulbs-uk> (stiahnuté 28.12.2018)
- <sup>29</sup><https://www.fruithillfarm.com/organic-narcissus-dutch-master.html> (stiahnuté 28.12.2018)
- <sup>30</sup>Berkov S., Nartínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S. Evolution of alkaloids biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 2014, 99, 95-106.
- <sup>31</sup>Bastida J., Viladomat F., Llabres J. M., Ramirez G., Codina C., Rubiralta M. *Narcissus* alkaloids, VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *J Nat Prod*. 1989, 52, 478-480.
- <sup>32</sup>Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio 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. *Arch Pharm Res*. 2018, 41, 208-218.
- <sup>33</sup>Bastida J., Lavilla R., Viladomat F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *Alkaloids Chem Biol*. 2006, 63, 87–179.
- <sup>34</sup>Hu M., Peng S., He Y., Qin M., Cong X., Xing Y., Liu M., Yi Z. Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget*. 2015, 6, 15348-15361.
- <sup>35</sup>Nagagawa Y., Uyeo S., Yayima H. The double bond in lycorine. *Chem Ind*. 1956, 1238 - 1239.
- <sup>36</sup>Nair J.J., Staden J. Cytotoxicity Studies of Lycorine Alkaloids of the Amaryllidaceae. *Nat Prod Commun*. 2014, 9, 1193–1210.
- <sup>37</sup>Greenwell M., Rahman P.K. Medicinal Plants: Their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res*. 2015, 6, 4103-4112.
- <sup>38</sup>Wang Y.H., Wan Q.L., Gu Ch.D., Luo H.R., Long Ch.L. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem Cent J*. 2012, 96.
- <sup>39</sup>Jiráček R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. Prax*. 2008, 4, 224-227.
- <sup>40</sup>[http://www.who.int/mental\\_health/neurology/dementia/dementia\\_thematicbrief\\_epidemiology.pdf?ua=1](http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/dementia_thematicbrief_epidemiology.pdf?ua=1). (stiahnuté 1.12.2019)
- <sup>41</sup>Mátl O., Mátlová M., Holmerová I. Zpráva o stavu demence 2016. 1. vyd. Česká alzheimerovská společnost, Praha 2016. (stiahnuté 1.12.2019)
- <sup>42</sup>An Y., Zhang C., He S., Yao C., Zhang L., Zhang Q. Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer's disease. *Life Sci J*. 2008, 5, 1-5.
- <sup>43</sup>Wightman E.L. Potential benefits of phytochemicals against Alzheimer's disease. *Proc Nutr Soc*. 2017, 76, 106–112.

- <sup>44</sup> Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2007, 3, 186–191.
- <sup>45</sup> <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>. (stiahnuté 1.12.2018)
- <sup>46</sup> Herle P., Brožová H., Jiráček R., Medová E., Novotná M., Roth J., Skála B., Šonka K., Špatenková V. Diferenciální diagnostika v neurologii. Raabe, Praha 2015.
- <sup>47</sup> Rössner P. Alzheimerova choroba—diagnostika a léčba. *Neurol. pro praxi.* 2004, 4, č. 1, 11–16.
- <sup>48</sup> Holmerová I., Baumanová M., Jurašková B., Vaňková H., Jiráček R. Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí. *Remedia.* 2014, 6, 474–478.
- <sup>49</sup> Magalingam K.B., Radhakrishnan A., Ping N.S., Haleagrahara N. Current concepts of neurodegenerative mechanisms in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 2018:3740461.
- <sup>50</sup> Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia.* 2009, 19, 342–345.
- <sup>51</sup> <http://alzheimers.alliedacademies.com/events-list/http-alzheimers-alliedacademies-com>(stiahnuté 2.3.2019)
- <sup>52</sup> Raboch J. Duševní poruchy, Alzheimerova choroba. Psychiatrie. Praha, Galén, 2001, 149–154.
- <sup>53</sup> Jiráček R. Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí. *Neurol. pro praxi.* 2009, 10, 384–389.
- <sup>54</sup> Swerdlow R.H., Khan S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. *Exp Neurol.* 2009, 218, 308–315.
- <sup>55</sup> Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010, 20 (Suppl. 2), 265–279.
- <sup>56</sup> Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2010, 362–329–44.
- <sup>57</sup> Gao X., Zheng Ch.Y., Yang L., Tang X.C., Zhang H.Y. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against  $\beta$ -amyloid peptide. *Free Radic Biol Med.* 2009, 46, 1454–1462.
- <sup>58</sup> Huang X.T., Qian Z.M., He X., Gong Q., Wu K.C., Jiang L.R., Lu L.N., Zhu Z.J., Zhang H.Y., Yung W.H., Ke Y. Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014, 35, 1045–1054.
- <sup>59</sup> Chen J.X., Yan S.S. Role of mitochondrial amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010, 569–578.
- <sup>60</sup> Montine T.J., Neely M.D., Quinn J.F., et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2002, 33, 620–626.
- <sup>61</sup> Zahid S., Khan R., Oellerich M., Ahmed N., Asif A.R. Differential S-nitrosylation of proteins in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2014, 256, 126–136.
- <sup>62</sup> Mullaart E., Boerrigter M.E., Ravid R., Swaab D.F., Vijg J. Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging.* 1990, 11, 169–173.
- <sup>63</sup> Lopez Salon M., Morelli L., Castaño E.M., Soto E.F., Pasquini J.M. Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2000, 62, 302–310.
- <sup>64</sup> Hroudová J., Singh N., Fišar Z., Ghosh K.K. Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *Eur J Med Chem.* 2016, 774–784 (stiahnuté 28.12.2018)
- <sup>65</sup> [https://www.alz.org/national/documents/topicsheet\\_betaamyloid.pdf](https://www.alz.org/national/documents/topicsheet_betaamyloid.pdf) (stiahnuté 5.12.2018)
- <sup>66</sup> Li Q., He S., Chen Y., Feng F., Qu W., Sun H. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2018, 463–477.

- <sup>67</sup>Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015, 16, 358-372.
- <sup>68</sup>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. Biodivers.* 2013, 10, 1120-1127.
- <sup>69</sup>[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amyloid-plaque\\_formation-big.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amyloid-plaque_formation-big.jpg) (stiahnuté 5.1.2019)
- <sup>70</sup>Thomas S.J., Grossberg G.T. Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging.* 2009, 367-377.
- <sup>71</sup>Claveria L.T., Tallini L., Viladomat M.F., Bastida J. Research in natural products Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII.* 2017, 5, 69-82
- <sup>72</sup>López P.S., Turon E.A., Garre O.J., Pericot N.I., Lozano G.M., Vilalta F.M., Hernández F.M., Morante M.V., Isern V.A., Gelada B.E., Majó L.J. Differential efficacy of treatment with acetylcholinesterase inhibitors in patients with mild and moderate Alzheimer's disease over a 6-month period. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005, 19, 189-195.
- <sup>73</sup>Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., Ribeiro F.M. Alzheimer's Disease: Targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol.* 2016, 14, 101-15.
- <sup>74</sup>Fišar Z. a kol.: Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie 2.vydání. Grada, Praha 2011.
- <sup>75</sup>Lawandi J., Gerber-Lemaire S., Juillerat-Jeanneret L., Moitessier N. Inhibitors of prolyl oligopeptidases for the therapy of human diseases: Defining diseases and inhibitors. *J Med Chem.* 2010, 53, 3423-3438.
- <sup>76</sup>Kato A., Fukunari A., Sakai Y., Nakajima T. Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997, 283, 328-335.
- <sup>77</sup>Petit A., Barelli H., Morain P., Checler F. Novel proline endopeptidase inhibitors do not modify A $\beta$ 40/42 formation and degradation by human cells expressing wild-type and Swedish mutated  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Br J Pharmacol.* 2000, 130, 1613-1617.
- <sup>78</sup>Šafratová M., Novák Z., Kulhánková A., Kuneš J., Hrabínová M., Jun D., Macáková K., Opletal L., Cahlíková L. Revised NMR data for 9-O-demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat Prod Commun.* 2014, 9, 787-788.
- <sup>79</sup>Farlow M.R., Small G.W., Quarg P., Krause A. Efficacy of Rivastigmine in Alzheimer's disease patients with rapid disease progression: Results of a Meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005, 20, 192-197.
- <sup>80</sup>Korabecny J., Zemek F., Soukup O., Spilovska K., Musilek K., Jun D., Nepovimova E., Kuca K. Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current state and future perspectives. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease.* Elsevier, 2015, 3-39.
- <sup>81</sup>Sramek J.J., Frackiewicz E.J., Cutler N.R. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine. *Exp Opin Inv Drug.* 2000, 9, 2393-2402.
- <sup>82</sup>Kumar V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. *Phytother. Res.* 2006, 20, 1023-1035.
- <sup>83</sup>Molino I., Colucci L., Fasanaro A.M., Traini E., Amenta F. Efficacy of memantine, donepezil, or their association in moderate-severe Alzheimer's disease: a review of clinical trials. *Sci World J.* 2013, 925702.
- <sup>84</sup>Zangara A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 75, 675-686.

- <sup>85</sup>Bai D. Development of huperzine A and B for treatment of Alzheimer's disease. *Pure Appl. Chem.* 2007, 79, 469-479.
- <sup>86</sup>Franková V. Dlouhodobé podávání kognitiv u Alzheimerovy nemoci. *Interní med.* 2004, 11, 554-557.
- <sup>87</sup>Scarpini E., Scheltens P., Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* 2003, 2, 539-547.
- <sup>88</sup>Franková V. Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Psychiatr.praxi.* 2015, 16, 79-82.
- <sup>89</sup>Lubbe A., Pomahačová B., Choi Y.H., Verpoorte R. Analysis of Metabolic Variation and Galanthamine Content in *Narcissus* Bulbs by 1H NMR†. *Phytochem anal.* 2009, 21, 66-72.
- <sup>90</sup>López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* 2002, 71, 2521-2529.
- <sup>91</sup><http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- <sup>92</sup>Tsvetkova D., Obreshkova D., Zheleva-Dimitrova D., Saso L. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Curr Med Chem.* 2013, 20, 4595-4608.
- <sup>93</sup>Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J. N-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008, 18, 2263-2266.
- <sup>94</sup>Havelek R., Seifrtova M., Kralovec K., Bruckova L., Cahlikova L., Dalecka M., Vavrova J., Rezacova M., Opletal L., Bilkova Z. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine.* 2014, 21, 479-490.
- <sup>95</sup>McNulty J., Nair J.J., Little J.R.L., Brennan J.D., Bastida J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010, 20, 5290-5294.
- <sup>96</sup>Elgorashi E.E., Malan S.F., Stafford G.I., van Staden J. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *S Afr J Bot.* 2006, 72, 224-231.
- <sup>97</sup><https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- <sup>98</sup>Vorlíček J., Hájek R., Adam Z., Pour L., Koptíková J., Šmardová J. Cílená léčba v onkologii. *Remedia.* 2005, 4-5, 390-404.
- <sup>99</sup>Doležalová L. Cílená léčba v onkologii solidních nádorů. *Prakt. Lékáren.* 2015, 11, 194-196.
- <sup>100</sup>Altmann K.H., Gertsch J. Anticancer drugs from nature: natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat Prod Rep.* 2007, 24, 327-357.
- <sup>101</sup>Sun Y., Wu P., Sun Y., Sharopov F.S., Yang Q., Chen F., Wang P., Liang Z. Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/b-catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 495, 911-921.
- <sup>102</sup>Nair J.J., Rarova L., Strnad M., Bastida J., Staden J. Mechanistic insight to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. *Nat Prod Commun.* 2015, 10, 171-182.
- <sup>103</sup>Sener B., Orhan I., Satayavivad J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother Res.* 2003, 17, 1220-1223
- <sup>104</sup>Thi Ngoc Tram N., Titorenkova T.V., St Bankova V., Handjieva N.V., Popov S.S. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia.* 2002, 73, 183-208.
- <sup>105</sup>Liu J., Hu W. X., He L. F., Ye M., Li Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Letters.* 2004, 17, 245-250.



- <sup>106</sup> Barthelmes H.U., Niederberger E., Roth T., Schulte K., Tang W.C., Boege F., Fiebig H.H., Eisenbrand G., Marko D. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. *Br J Cancer*. 2001, 85, 1585-1591.
- <sup>107</sup> Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014, 64, 9–29.
- <sup>108</sup> 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*. 2017, 60, 417-428.
- <sup>109</sup> Khan M.A., Chen H.C., Zhang D., Fu J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol*. 2013, 34, 2497–2506.
- <sup>110</sup> Cao Z., Yu D., Fu S., Zhang G., Pan Y., Bao M., Tu J., Shang B., Guo P., Yang P., Zhou Q. Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity. *Toxicol Lett*. 2013, 218, 174-185.
- <sup>111</sup> Ceriotti G. Narciclasine: an antimetabolic substance from narcissus bulbs. *Nature* 1967. 213, 595–596.
- <sup>112</sup> Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., Ribaucour F., Thomas S., Roland I., Darro F., Lefranc F., Kiss R. The Amaryllidaceae isocarbostryril narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*. 2007, 9, 766–776.
- <sup>113</sup> Lefranc F., Brotchi J., Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*. 2005, 23, 2411–2422.
- <sup>114</sup> Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A.H., et al. (–)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry*. 2004, 65, 2113-2118.
- <sup>115</sup> Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á. G., Estévez-Braun A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorgan. Med. Chem*. 2012, 20, 5464-5472.
- <sup>116</sup> Ingrassia L., Lefranc F., Dewelle J., Pottier L., Mathieu V., Kreinecker S.S., Sauvage S., Yazidi E.M., Dehoux M., Berger W., Quaquebeke V.E., Kiss R. Structure-activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryril derivative) as potential anticancer agents. *J Med Chem*. 2009, 52, 1100-1114.
- <sup>117</sup> Nair J.J., Bastida J., Codina C., Viladomat F., van Staden J. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a review. *Nat. Prod. Commun*. 2013, 9, 1335-1350
- <sup>118</sup> McLachlan A., Kekre N., McNulty J., Pandey S. Pancreatistatin: a natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis*. 2005, 10: 619-630.
- <sup>119</sup> Don A.S., Hogg J.P. Mitochondria as cancer drug targets. *Trends Mol Med*. 2004, 10, 372-378.
- <sup>120</sup> Fantin V.R., Leder P. F16, a mitochondriotoxic compound, trigger apoptosis or necrosis depending on the genetic background of the target carcinoma cell. *Cancer Res*. 2004, 64, 329–336.
- <sup>121</sup> Goietsenoven G., Mathieu V., Lefranc F., Kornienko A., Evidente A., Kiss R. Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryrils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Med Res Rev*. 2013, 33, 439-455.
- <sup>122</sup> Siedlakowski P., McLachlan-Burgess A., Griffin C., Tirumalai S.S., McNulty J., Pandey S. Synergy of Pancreatistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biol. Ther*. 2008, 7, 376-384.
- <sup>123</sup> Nair J.J., Rarova L., Strnad M., Bastida J., van Staden J.: Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012, 26, 6195-6199.
- <sup>124</sup> Havelek R., Muthna D., Tomšík P., Královec K., Seifrtová M., Cahlíková L., Hošťálková A., Šafratová M., Perwein M., Čermáková E., Řezáčová M. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by

screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chem-Biol Interact.* 2017, 275, 121-132.

<sup>125</sup>Hroch M., Havelek R., Cahlíková L., Hošťálková A., Hulcová D., Cermanová J., Mičuda S. LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2016, 30, 1083-1091.

<sup>126</sup>Huang S.D., Zhang Y., He H.P., Li S.F., Tang G.H., Chen D.Z., Cao M.M., Di Y.T., Hao X.J. A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chin J Nat Med.* 2013, 11, 406-410.

<sup>127</sup>Küenburg B., Czollner L., Fröhlich J., Jordis U. Development of a Pilot Scale Process for the Anti-Alzheimer Drug (-)-Galanthamine Using Large-Scale Phenolic Oxidative Coupling and Crystallisation-Induced Chiral Conversion. *Org. Process Res. Dev.* 1999, 3, 425-431

<sup>128</sup>Mizerová V. Strukturní analýza alkaloidů pomocí NMR spektroskopie. Katedra organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Praze v Hradci Králové. 2018, Diplomová práce

<sup>129</sup>Ang S., Liu X.M., Huang X.J., Zhang D.M., Zhang W., Wang L., Ye W.C. Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* and their cytotoxicity. *Planta Med.* 2015, 81, 1712-1718

<sup>130</sup>Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová M., Hošťálková A., De Simone A., Andrisano V., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. *Molecules.* 2018, 23, 1-9.

<sup>131</sup>Czollner L., Treu M., Froehlich J., Kueenburg B., Jordis U. Synthesis of galanthamine. *Arkivoc.* 2001, 1, 191-200.