

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita II.
Alkaloids of the family Amaryllidaceae and their biological activity II.

Vypracoval: Štefan Kosturko

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Hradec Králové, srpen 2020

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Čestně prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita II.“ a sní související přílohu, vypracoval samostatně pod vedením a dohledem vedoucí diplomové práce, paní PharmDr. Marcely Šafratové, Ph.D.

Všechny literární prameny, které jsem použil k vypracování diplomové práce a její přílohové části, jsem řádně citoval a uvedl v seznamu použité literatury na konci práce.

Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.



Kosturko Štefan

V Hradci Králové, srpen 2020

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl poděkovat mojí vedoucí diplomové práce, paní PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D., za její odborný dohled, trpělivost a pomoc při vypracování diplomové práce. Taktéž jí patří velké poděkování za čas strávený konzultacemi a pomocí, se zpracováním experimentální částí diplomové práce v čase jejího osobního volna, a to i v pozdních nočních hodinách.

Poděkování patří taktéž, paní PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D., za její pomoc při práci na experimentální částí práce. Taktéž chci poděkovat, paní PharmDr. Kateřině Breiterové, Ph.D., za její pomoc a konzultace v čase nepřítomnosti doktorky Šafratové nebo Hulcové.

V neposlední řadě děkuji panu doc. Jiřímu Kunešovi, Ph.D., za změřením a pomoc při interpretaci NMR spekter.

Nakonec chci poděkovat celému kolektivu Katedry farmakognozie a Katedry farmaceutické botaniky, za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	9
3. Čeleď Amaryllidaceae	10
3.1. Obecná charakteristika rostlin z čeledi Amaryllidaceae	10
3.1.1. Rod <i>Narcissus</i> L.	11
3.1.2. <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. 'Dutch Master'	13
3.2. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	17
3.2.1. Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů – norbelladinová cesta	17
3.2.2. Struktura a biologická aktivita amarylkovitých alkaloidů	20
3.2.2.1. Skupina alkaloidů belladinového typu	20
3.2.2.2. Skupina alkaloidů lykorinového typu	21
3.2.2.3. Skupina alkaloidů homolykorinového typu	24
3.2.2.4. Skupina alkaloidů galanthaminového typu	25
3.2.2.5. Skupina alkaloidů haemanthaminového a krininového typu	27
3.2.2.6. Skupina alkaloidů narciklasinového typu	30
3.2.2.7. Skupina alkaloidů tazettinového typu	32
3.2.2.8. Skupina alkaloidů montaninového typu	33
3.2.2.9. Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám	37
3.2.3. Alkaloidy druhu <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	38
4. Alzheimerova nemoc	41
4.1. Neuropatologie Alzheimerovy nemoci	41
4.1.1. Senilní plaky amyloidu β	41
4.1.2. Neurofibrilární klubka hyperfosforylovaného τ proteinu	43
4.1.3. Cholinergní a glutamátergní hypotéza	44
4.2. Terapie Alzheimerovy nemoci	46
4.2.1. Potenciální fytofarmakologické možnosti terapie Alzheimerovy nemoci	47
4.2.1.1. Enhancery α -sekretasy	47
4.2.1.2. Inhibitory β -sekretasy	48
4.2.1.3. Inhibitory glykogensyntasy kinasy 3β a cyklin-dependentní kinasy 5	49
4.2.1.4. Inhibitory prolyl oligopeptidasy	50
4.2.1.5. Inhibitory cholinesteras	51
5. Experimentální část – materiál, metody a přístrojové vybavení	53
5.1. Materiál použitý při separaci vzorku	53

5.1.1.	Rozpouštědla	53
5.1.2.	Chemikálie	53
5.1.3.	Detekční činidla	53
5.1.3.1.	Dragendorffovo činidlo – zásobní roztok	53
5.1.3.2.	Dragendorffovo činidlo – detekční roztok.....	53
5.1.3.3.	Mayerovo činidlo	54
5.1.4.	Stacionární fáze pro chromatografii na tenké vrstvě	54
5.1.5.	Mobilní fáze pro chromatografii na tenké vrstvě.....	54
5.1.6.	Pomocný materiál	55
5.2.	Přístrojové vybavení	55
5.3.	Rostlinný materiál	55
5.3.1.	Droga pro přípravu extraktu.....	55
5.3.2.	Příprava extraktu.....	55
5.4.	Metody použité při separaci vzorku	55
5.4.1.	Destilace	55
5.4.2.	Preparativní chromatografie na tenké vrstvě	56
5.4.3.	Eluce	56
5.4.4.	Odpařování pomocí vakuové rotační odparky	56
5.4.5.	Extrakce v děličce – „vytřepávání“	57
5.4.6.	Rekrystalizace	57
5.4.6.1.	Rekrystalizace pod zpětným chladičem.....	58
5.4.6.2.	Rekrystalizace odpařením rozpouštědla	58
5.5.	Metody použité při strukturní analýze	58
5.5.1.	Analýza pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem	58
5.5.2.	Analýza pomocí vodíkové nukleární magnetické rezonance	59
5.5.3.	Analýza pomocí uhlíkové nukleární magnetické rezonance	59
5.5.4.	Polarimetrie	59
5.6.	Materiál a přístroje použité při stanovení biologické aktivity.....	59
5.6.1.	Stanovení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám	59
5.6.1.1.	Chemikálie	59
5.6.1.2.	Tlumivé roztoky – pufrý.....	60
5.6.1.3.	Přístrojové vybavení	60
5.6.1.4.	Stanovované enzymy a jejich původ	60
5.6.2.	Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase	60
5.6.2.1.	Chemikálie	60
5.6.2.2.	Tlumivé roztoky – pufrý.....	60

5.6.2.3.	Přístrojové vybavení	61
5.6.2.4.	Stanovovaný enzym.....	61
5.6.3.	Stanovení inhibiční aktivity vůči glykogensyntase kinase 3 β	61
5.6.3.1.	Chemikálie	61
5.6.3.2.	Přístrojové vybavení	61
5.6.3.3.	Stanovovaný enzym.....	61
5.7.	Metody použité při stanovení biologické aktivity	61
5.7.1.	Metoda stanovení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám	61
5.7.2.	Metoda stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase	62
5.7.3.	Metoda stanovení inhibiční aktivity vůči glykogensyntase kinase 3 β	63
6.	Experimentální část – vlastní metodika izolace alkaloidů	64
6.1.	Zóna Z – 1	65
6.2.	Zóna Z – 2	66
6.3.	Zóna Z – 3	67
6.4.	Zóna Z – 4	68
6.5.	Zóna Z – 5	69
7.	Výsledky strukturní analýzy alkaloidů	70
7.1.	Zóna Z – 1/1	71
7.2.	Zóna Z – 2/2*B.....	72
7.3.	Zóna Z – 3/1*A.....	73
7.4.	Zóna Z – 4/2*A.....	74
7.5.	Zóna Z – 5/3*A.....	75
8.	Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči <i>in vitro</i> testovaným enzymům.....	76
9.	Diskuse a závěr	77
10.	Abstrakt	79
11.	Abstract	80
12.	Seznam použité literatury	81
13.	Seznam obrázků, tabulek a rovnic.....	90
14.	Seznam použitých zkratk	92
15.	Seznam použitých zkratk nádorových a nenádorových buněčných linií	94

1. Úvod

Různé části rostlin, živočichů nebo nerostných surovin jsou již od nepaměti součástí lidské existence. Ze začátku sloužily spíše jako zdroj potravy, později také jako léčebné prostředky lidové medicíny. Metodou pokus-omyl a postupnou evolucí lidského druhu se lidé naučili s tímto přírodním materiálem pracovat a plně využívat hlavně jeho nutriční a léčebný potenciál. Prvně se zpracovávaly celé rostliny, v surovém nebo sušeném stavu, do nejrůznějších prvotních jednoduchých lékových forem, jako například obklady, zábaly, nálevy, výluhy, tinktury, léčivá vína, léčivé koupele aj. Tyto formy se používají dodnes hlavně jako prostředky lidové medicíny převážně k samoléčbě méně závažných onemocnění. Později se začaly objevovat i složitější, modernější lékové formy například oční kapky, masti, tablety, tobolky, šampony, čípky a jiné. Mimo výše zmíněného se tyto přírodní produkty využívají dodnes také ve formě nejrůznějších amuletů, talismanů, vykuřovadel, elixírů či vonných tyčinek k nejrůznorodějším magickým rituálům a kouzlům, masážním procedurám, meditacím, očišťování těla i mysli aj. Lidská touha po vědomostech a nezastavitelný vývoj společnosti, odhalili fakt, že rostliny neléčí celé, ale obsahují ve svých různých částech strukturně různé látky, které jsou zodpovědné za jejich léčebný účinek. Tento fakt neprodleně vedl k potřebě podrobnějšího prozkoumání jednotlivých obsahových látek rostlin z hlediska jejich biosyntézy, struktury a celkového účinku na lidský organismus.

Sekundární metabolismus rostlin umožňuje rostlinám různými biosyntetickými cestami vytvářet rozličné typy látek z prekurzorových molekul, které pocházejí z jejich primárního metabolismu. Tyto látky označujeme jako produkty sekundárního metabolismu a jejich výskyt může být pro některé čeledi charakteristický – například silice se charakteristicky vyskytují u druhů čeledi Lamiaceae a Apiaceae, isochinolinové alkaloidy u čeledi Papaveraceae a Amaryllidaceae. Postupem času se lidstvo naučilo tyto metabolity efektivně izolovat, semisynteticky nebo plně synteticky je produkovat, připravovat jejich chemické obměny a využívat je k léčbě různorodých akutních nebo chronických onemocnění. Příkladem může být kardioglykosid digoxin, využívaný jako kardiotonikum při léčbě chronického srdečního selhání nebo využití isochinolinových alkaloidů – morfin jako analgetikum k tlumení bolesti, kodein jako antitusikum při suchém kašli nebo galanthamin jako psychoanaleptikum při léčbě demence. V dnešní době se samotné sekundární metabolity používají v terapii spíše omezeně. Mnohem častěji se využívají rostlinné extrakty, které jsou komplexním souborem vícerých obsahových látek mající společný nebo navzájem se doplňující účinek při terapii.

Velice zajímavou a užitečnou skupinou sekundárních metabolitů některých druhů vyšších cévnatých rostlin jsou organické heterocyklické bazické látky označované jako alkaloidy. Vyskytují se převážně u rostlin dvouděložných krytosemenných, také u rostlin jednoděložných a méně u rostlin nahosemenných. Vyjma těchto rostlin se alkaloidy vyskytují také v některých druzích

kaprad'orostů a přesliček (*Lycopodium* spp. a *Equisetum* spp.) a houbách (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.). Biosyntetizují se především z aminokyselin, na základě čeho je můžeme rozčlenit do několika skupin, a to na alkaloidy odvozené od fenylalaninu a tyrosinu (protoalkaloidy a isochinolinové alkaloidy), alkaloidy odvozené od tryptofanu (indolové, chinolinové alkaloidy), alkaloidy odvozené od histidinu (imidazolové alkaloidy), alkaloidy odvozené od ornithinu a lysinu (pyridinové, piperidinové, chinolizidinové a tropanové alkaloidy). Dále rozlišujeme steroidní a terpenické alkaloidy, které souhrnně označujeme jako pseudoalkaloidy, protože dusík přítomný v cyklu nepochází z aminokyseliny, ale je vnášen do molekuly pomocí transaminace na konci biosyntézy ^[1]. V cévnatých rostlinách se předpokládá existence více než 20 000 různých alkaloidních substancí rozličných strukturních typů. Význam alkaloidů v rostlinách není zatím plně pochopen. Předpokládá se jejich uplatnění jako obranný prostředek proti predátorům a škůdcům například na základě jejich hořké chutě nebo toxicity anebo zvýšením reparace poškozených tkání. Taktéž můžou zlepšovat obranyschopnost rostlin vůči biotickým a abiotickým stresorům nebo lákat opylovače a roznašeče semen ^[2].

Jak již plyne z názvu práce, byla veškerá pozornost věnována zejména alkaloidům pocházejících z čeledi Amaryllidaceae. Jedná se o alkaloidy isochinolinového typu, které se biosyntetizují prostřednictvím norbelladinové biosyntetické cesty z aminokyselin fenylalaninu a tyrozinu. Amaryllkovité alkaloidy se vyznačují rozmanitou biologickou aktivitou. Mezi nejvýznamnější účinky těchto alkaloidů nepochybně patří inhibice cholinesteras (ChE) důsledkem, čeho se zvyšuje množství mediátoru acetylcholinu (ACh) v synaptické štěrbině a tím je posílen synaptický přenos nervového signálu. Je dokázáno, že signifikantně zvýšené množství ACh v určitých částech mozku pozitivně ovlivňuje pacienty s různými typy demence, například pacienty s Alzheimerovou demencí (AD). Z amaryllkovitých alkaloidů je v dnešní době pro toto terapeutické použití registrován pouze jeden jediný alkaloid, a to galanthamin. Terapeutické použití dalších amaryllkovitých alkaloidů u AD je omezeno jejich nadměrnou cytotoxicitou nebo slabými inhibičními účinky vůči již zmíněným ChE. Z dalších biologických vlastností těchto alkaloidů lze zmínit například aktivitu antineoplastickou, antimykotickou, antivirotickou, antiparazitární nebo analgetickou.

Teoretická část práce pojednává o základní charakteristice čeledi Amaryllidaceae, rodu *Narcissus* L. a dále také o Alzheimerové nemoci a možnostech její terapie.

Experimentální část práce pojednává hlavně o izolaci, následné separaci a purifikaci jednotlivých amaryllkovitých alkaloidů z předem přiděleného alkaloidního extraktu. Práce dále pojednává o stanovení biologické aktivity a identifikaci struktury u jednotlivých separovaných alkaloidů.

Pro lepší přehlednost práce byla formou samostatného dodatku, vyhotovena obrazová příloha, která je její nedílnou součástí.

2. Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo pomocí specifických chromatografických a chemických metod izolovat a purifikovat alkaloidy, které byly obsažené v sumárním extraktu, který byl připraven paní PharmDr. Danielou Hulcovou Ph.D., v rámci její disertační práce, z čerstvých cibulí rostlinného druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Dutch Master'.

Další cíle byly:

- získat alespoň dvě látky povahy alkaloidů v čistém stavu a dostatečném množství, které by umožnilo jejich prostudování z hlediska struktury a biologických účinků,
- spolupráce na identifikaci struktury alkaloidů pomocí jim specifických GC-MS a NMR spekter,
- spolupráce na určení inhibičních aktivit vůči lidské acetyl- a butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase a glykogensyntase kinase 3 β ,
- zpracování literární rešerše se zaměřením na alkaloidy čeledě Amaryllidaceae, rod *Narcissus* L. a jejich biologickou aktivitu.

3. Čeleď Amaryllidaceae

Rostliny čeledi Amaryllidaceae (amarylkovité) patří mezi jednoděložné krytosemenné rostliny. V čeledi Amaryllidaceae se vyskytuje více než 1600 druhů klasifikovaných do 75 rodů (Příloha 1 a Příloha 2) ^{[3][4]}. Již po tisíce let jsou rostliny používány ve formě rozličných kataplazmat, výluhů a extraktů a jsou součástí tradiční medicíny v rozličných zeměpisných šířkách planety. Například *Crinum jagus* (J.Thomps.) Dandy se tradičně využívá v Senegalu jako antiinfekční prostředek pro léčbu veškerých poranění. V Nigérii se zas tradičně používá extrakt získaný z cibulí *Crinum glaucum* A. Chev. a *Crinum jagus* (J.Thomps.) Dandy jako lék na nejrůznější duševní nemoci ^[5]. Starodávni Mayové používali druh *Hymenocallis litorallis* (Jacq.) Salisb. jako lék proti rakovině. V Jižní Africe byly zase proti rakovině používány cibule druhu *Boophone disticha* (L.f.) Herb. Odvar z listů druhu *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. se dodnes používá v Jižní Americe jako prostředek proti diabetu ^[6]. Nakonec nelze opomenout také *Allium sativum* L., který byl znám již v starověkem Řecku pod názvem „páchnoucí růže“ jako univerzální prostředek pro léčbu veškerých nemocí ^[7].

3.1. Obecná charakteristika rostlin z čeledi Amaryllidaceae

Druhy této čeledi se přirozeně vyskytují v tropických a subtropických oblastech světa, a to převážně v Jižní Africe (zejména Kapská oblast), Jižní a Severní Americe a Středomoří, přičemž s některými volně rostoucími druhy rodů *Narcissus* L., *Leucojum* L. a *Galanthus* L. se běžně můžeme setkat i v České republice. V minulosti se druhy této čeledi pěstovaly obzvláště pro jejich okrasnou funkci. V dnešní době je čeleď amarylkovitých studována spíše z fytochemického hlediska kvůli obsahu velkého množství sekundárních metabolitů, zejména alkaloidů, které vykazují rozmanitou biologickou aktivitu ^{[3][8]}. Rostliny této čeledi jsou vytrvalé byliny, pro které je charakteristická přítomnost podzemní cibule, oddenku nebo cibulové hlízy. Stonek je nejčastěji ve formě stvolu (někdy stopka) a většinou je neolistěný. Olistěný stonek můžeme najít u některých zástupců rodu *Allium* L. (*Allium flavum* L.). Typické jsou úzké, obvykle čárkovité přízemní listy. Květy, podepřené blanitým listenem, rostou zpravidla jednotlivě nebo v okolíkovitých květenstvích (šroubelovitá nebo hroznovitá). Květy jsou oboupohlavní, na první pohled aktinomorfní nebo s náznakem zygomorfismu. Koruna se skládá ze šesti okvětních lístků ve dvou přeslenech 3+3, které mohou být volné nebo srostlé a formovat korunní trubku (pakorunku). Semeník je spodní, málokdy svrchní, a je složen ze šesti plodolistů. Obvykle se vyskytuje trojpodzdrý semeník, vzácně také jednopouzdrý. Někdy mohou být na semeníku přítomné také nektária (*Nothoscordum gracile* (Aiton) Stearn). Blizna je obvykle trojlaločná. Obvyklá je přítomnost šesti tyčinek ve dvou přeslenech 3+3, které jsou buď volné nebo srostlé s korunní trubkou. Vzácně mohou být přítomny pouze tři tyčinky (*Zephyra compacta* C. Ehrh.). Plod je obvykle tobolka, zřídka nažka (*Ammocharis longifolia* (L.) Herb.) nebo bobule (*Scadoxus puniceus* (L.) Friis & Nordal) ^{[8][9]}.

3.1.1. Rod *Narcissus* L.

Podle pradávnej řecké mytologie existoval mladý a pohledný pastevec jménem Narcissus, který byl milován všemi lesními nymfami, nejvíc však nymfou jménem Echo, která byla zakletá bohyní Hérrou. Skrze prokletí uměla Echo zopakovat pouze poslední slovo, které od někoho slyšela, a tak nedokázala lásku pastevcovi projevit. Narcissus se o lásce dozvěděl, ale lásku ji neopětoval. Nymfu svým nezájmem zraňoval a ta postupně chřadla a ztrácela se, až z ní nakonec zůstal jenom tichý hlásek. Bohyně lásky Venuše uslyšela její beznadějnou oddanost a rozhodla se mladého pastevence za jeho nezájem a ignorantství potrestat. Venuše učinila dohodu s bohem lásky, Amorem, a ten na mladého pastevence uvalil kouzlo, které mělo způsobit, že se zamiluje do první osoby, kterou spatří. Jednoho dne se Narcissus na potulkách lesem zastavil při křišťálově čistém jezírku, aby se schladil. V odrazu, na vodní hladině, spatřil svou tvář a zamiloval se sám do sebe. Každý den se pastevec vracel k jezírku v naději, že tvář na hladině zachytí, ale nikdy se mu to nepovedlo. Narcissus tak pomalu chřadnul neopětovanou láskou. Když bohové viděli, co se děje, rozhodli se Narcisse přeměnit na jemnou, papírovou květinu, která měla navěky spočinout při jezírku jako symbol egoistického mládí^[10].

Druhy rodu *Narcissus* L. patří mezi jednoděložné krytosemenné rostliny – cibuloviny. Z celkového počtu druhů vyskytujících se v čeledi Amaryllidaceae, přispívá k tomuto počtu rod *Narcissus* L. 80 botanickými druhy a velkým množstvím jejich kultivarů. Hlavní odlišnosti rodu od ostatních amarylkovitých rostlin je přítomnost pakorunky, obvykle ve tvaru trubky ('trumpet') nebo prstence/pohárku ('cup'). Stanoviště rodu *Narcissus* L. zahrnuje především středomořskou oblast, hlavně Pyrenejský poloostrov, jihozápadní Francii, severní Afriku a východ Řecka, přičemž některé druhy můžeme typicky najít i mimo jejich obvyklý areál výskytu. Například *Narcissus tazetta* L. (Příloha 3) můžeme vyjma středomoří najít také v Číně a Japonsku, což může historicky poukazovat na zájem východní populace o pěstování okrasných rostlin, které se jak na blízky, tak daleký východ pravděpodobně dovážely ze středomoří prostřednictvím hedvábné stezky^[11].

Nadměrný sběratelský zájem obyvatelstva, přehnaná hybridizace a sběr divokých cibulí k výzkumu v kontextu s postupným osídlováním a zastavováním přirozených biotopů narcisů vedly v minulosti k markantnímu poklesu populace některých jejich volně žijících druhů. Podle Red List of Threatened Species IUCN z roku 1999 byly v kategorii ohrožený druh zařazeny tři druhy narcisů. Do dnešního dne jejich počet několikanásobně vzrostl, konkrétně na počet deset druhů¹. Jmenovitě lze uvést například druh *Narcissus willkommii* (Samp.) A.Fern. původem z Portugalska (Příloha 4) nebo *Narcissus jacquemoudii* Fern.Casas původem z Maroka² (Příloha 5)^{[11][12][13]}. Pro globální omezení

¹ Informace platná ke dni 12.srpna.2020. Získáno z webu IUCN po zadání hesla Narcissus.

² V roce 2018 byl předpokládán počet jedinců u *Narcissus willkommii* (Samp.) A.Fern. 1482 a u *Narcissus jacquemoudii* Fern.Casas pouhých 50-150^{[12][13]}.

těchto negativních dopadů (ne jenom u rodu *Narcissus* L.) byly založeny různé genetické sbírky, které uchovávají genetické informace nejrůznějších rostlinných druhů jak ohrožených, tak běžně se vyskytujících, pro budoucí výzkum a šlechtitelské účely. Dalšími užitečnými nástroji ochrany jsou také rozličné pěstitelské reprodukční systémy a odběr rostlinného materiálu k screeningu z komerčních zahradnictví ^[11].

Typický výskyt druhů rodu *Narcissus* L. je na otevřených travnatých stanovištích, které zahrnují jak nízko položené močály a břehy řek, tak skalnaté svahy, pastviny i vysokohorské oblasti. Téměř všechny druhy rodu *Narcissus* L. začínají rozkvétat na konci zimy až začátkem jara, kdy vlivem snížených teplot podzemní cibule velice rychle vytvoří mohutný stonek a následně vykvétá. Výjimku tvoří například *Narcissus broussonetti* Lag. (Příloha 6), *Narcissus cavanillesii* Barra & G.López (Příloha 7), *Narcissus elegans* (Haw.) Spach (Příloha 8), *Narcissus serotinus* L. (Příloha 9) a *Narcissus viridiflorus* Schousb. (Příloha 10), které začínají rozkvétat počátkem podzimu. Krátce po zakvetení nastává rychlé stárnutí a opadání listů a květů. Následně nastupuje stádium letní dormance (fáze spánku; „letní spánek“), prostřednictvím kterého si rostlina brání podzemní orgány před predátory, hlavně vysokým obsahem hořkých alkaloidů, a také proti nadměrnému vysušení ^{[11][14]}. Podzemním orgánem je dužnatá cibule, kulovitého nebo vejčitého tvaru. Dosahuje velikost kolem deseti centimetrů. Její charakteristickou vlastností je každoroční vytváření nových, mladých cibulí prostřednictvím zakládání nových suknic ^{[11][15]}. Druhy rodu *Narcissus* L. dosahují v dospělosti výšky v průměru kolem 40–60 cm. Stonek je ve formě stvolu, je dutý, na průřezu hranatý a neolistěný. Listy obvykle dosahují velikosti 2/3 délky stonku. Jsou přisedlé a situovány v přízemní růžici. Mají souběžnou žilnatinu, celistvou čepel, na konci jsou zašpičatělé a mají jemný, matný sivozelený nádech. Počet listů se obvykle pohybuje kolem dvou–čtyř ^{[15][16]}.

Jedná se o hmyzosprašné druhy rostlin, které lákají opylovače (včely, mouchy a motýli) pomocí svých nápadných květů, z kterých navíc některé mají příjemnou vůni. Květy jsou obojpohlavní a mají bílou, světle nebo tmavě žlutou barvu. Jejich průměrná velikost je 12–125 mm. Květy se na stonku nacházejí zpravidla samostatně anebo jsou přítomny v květenstvích kolem deseti–patnácti kusů, jako je tomu například u *Narcissus papyraceus* Ker Gawl. (Příloha 11) nebo *Narcissus tazetta* L. ^{[11][14]}. Koruna se skládá ze šesti korunních lístků ve dvou přeslenech (3+3), které srůstají a formují pakorunku rozličných tvarů ^[17]. Barevnou výjimku tvoří, v noci kvetoucí, *Narcissus viridiflorus* Schousb., který má malé nenápadné zelené květy, silné vůně, pomocí kterých láká noční opylovače ^[14].

Klasifikace rodu *Narcissus* L. je značně komplikovaná a může za to hlavně intenzivní mezidruhov故事 hybridizace, jak ve volné přírodě (vznikají poddruhy), tak v rámci rozličných šlechtitelských

programů (vznikají kultivary). Pro klasifikaci rodu *Narcissus* L. se dnes využívá botanická nebo zahradnická klasifikace.

Botanické třídění rodu je založeno na dlouholetých cytologických a genetických studiích a jeho základ položil Dr. A. Fernandes v roce 1975. Tato klasifikace byla později mnoha autory upravena. Například klasifikace podle Briana Mathewse z roku 2002 rozlišuje podrod *Corbularia* (syn. *Bulbocodium*) zatímco Dr. A. Fernandes klasifikuje *Bulbocodium* jako sekci v podrodu *Narcissus*. Oficiální klasifikaci nakonec vydala v roce 2013 britská The Royal Horticultural Society (RHS; nejnovější úprava prosinec 2017), která má téměř shodné dělení druhů do sekcí s klasifikací podle Mathewse. Klasifikace podle RHS rozlišuje deset základních sekcí a jednu sekci interdruhových hybridů jednotlivých sekcí. Jmenovitě se jedná o sekce *Tazettae*, *Serotini*, *Aurelia*, *Apodanthi*, *Jonquilla*, *Tapeinanthus*, *Ganymedes*, *Bulbocodium*, *Pseudonarcissus* a *Narcissus* ^{[18][19]}. Porovnání botanické klasifikace podle Mathewse (2002) a RSH (2017) uvádí [Tabulka 1](#).

Zahradnické třídění je naopak založeno na množství květů nesených stonkem a velikostním poměrem mezi pakorunkou a kalichem. Na základě toho se druhy rodu *Narcissus* L. rozdělují do jednotlivých skupin (divizí). Celkově je známo 13 divizí a jedna sekce miniaturních hybridů ^{[20][21]}. Přehled a stručná charakteristika jednotlivých divizí je uvedena v [Tabulka 2](#). Obrázkové zobrazení jednotlivých divizí je uvedeno v [Příloha 12](#).

3.1.2. *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Dutch Master'

Kultivar 'Dutch Master' (volně přeloženo jako „holandský mistr“) poprvé vyšlechtil nizozemský obchodník s narcisy, pan Matthew Zandbergen (*1903 – †1990) v roce 1938 v Holandsku. The American Daffodil Society řadí tento kultivar do divize 1 a je značen barevným kódem Y-Y, znamenajícím, že kališní lístky i korunní trubka (pakorunka) jsou žluté barvy. Kompletní označení je tedy 1 Y-Y ^{[22][23]}.

Doba kvetení kultivaru je okolo počátku–půlky jara. Rostlina dorůstá do velikosti 67,5 cm a víc. Velikost květů se pohybuje kolem 11 cm. Segmenty květného obalu jsou oválného tvaru a mají charakteristické zelenožluté zbarvení, z jedné třetiny se překrývají a jsou zakončeny jemným zahrocením. Koruna má charakteristický válcovitý tvar, je hladká, na konci rozšířená a pravidelně vroubkovaná. Koruna má kobaltově žlutou barvu ^{[22][23]}.

Kultivar 'Dutch Master' byl prvně registrován v roce 1948. V roce 1976 získal, od britské RHS, prestižní ocenění FCC ('First Class Certificate') jako druh rostliny, který je vhodný pro výstavy. Následně byl v roce 1995 opětovně oceněn britskou RHS, cenou AGM ('Award of Garden Merit'), jako vynikající druh rostliny, který se hodí pro okrášlení otevřených nebo zasklených zahrad ^{[22][23]}.

‘Dutch Master’ posloužil jako rodičovská rostlina při hybridizaci nových kultivarů narcisů. Celkem se podílí na vzniku třinácti nových kultivarů. Jedenáctkrát z třinácti posloužil jako dárce semen a dvakrát jako dárce pylu. Dal vzniknout dalším kultivarům jako například kultivar cv. ‘Ballade’, cv. ‘Best seller’, cv. ‘Emblyn’, cv. ‘Prizewinner’, cv. ‘Waldock’ a další ^{[22][23]}. Taxonomické zařazení *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. ‘Dutch Master’ nalezneme v Tabulka 3. Obrázkové zobrazení *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. ‘Dutch Master’ je uvedeno v Příloha 13 a Příloha 14.

Tabulka 1 – Botanické třídění rodu *Narcissus* L. podle Mathewse a The Royal Horticultural Society ^{[18][19]}

MATHEWS 2002			RHS 2017
PODROD	SEKCE	DRUH	SEKCE
NARCISSUS	<i>Narcissus</i>	<i>Narcissus poeticus</i> L. <i>Narcissus radiiflorus</i> Salisb.	<i>Narcissus</i>
	<i>Pseudonarcissus</i>	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. <i>Narcissus cyclamineus</i> DC.	<i>Pseudonarcissus</i>
	<i>Ganymedes</i>	<i>Narcissus triandrus</i> L. <i>Narcissus lusitanicus</i> Dorda & Fern.Casas	<i>Ganymedes</i>
	<i>Jonquillae</i>	<i>Narcissus jonquilla</i> L. <i>Narcissus willkommii</i> (Samp.) A.Fern. <i>Narcissus viridiflorus</i> Schousb.	<i>Jonquilla</i>
		<i>Narcissus rupicola</i> Dufour	<i>Apodanthi</i>
<i>Tapeinanthus</i>	<i>Narcissus cavanillesii</i> Barra & G.López	<i>Tapeinanthus</i>	
HERMIONE	<i>Hermione</i>	<i>Narcissus tazetta</i> L. <i>Narcissus papyraceus</i> Ker Gawl.	<i>Tazettae</i>
		<i>Narcissus elegans</i> (Haw.) Spach	Hybridy sekcí
	<i>Aurelia</i>	<i>Narcissus serotinus</i> L.	<i>Serotini</i>
CORBULARIA	<i>Bulbocodium</i>	<i>Narcissus bulbocodium</i> L. <i>Narcissus jacquemoudii</i> Fern.Casas	<i>Bulbocodium</i>

Tabulka 2 – Zahradnické třídění rodu *Narcissus* L. a charakteristika jednotlivých divizí [20][21]

ČÍSLO DIVIZE	‘NÁZEV ANGLICKY’ NÁZEV ČESKY	STRUČNÍ CHARAKTERISTIKA A PŘÍKLAD TYPICKÉHO HYBRIDU
1	‘Trumpet Daffodils’ Trubkovité hybridy	Jeden květ na stonku; trubkovitá pakorunka Pakorunka stejně dlouhá nebo delší než kalich <i>Narcissus</i> cv. ‘American Dream’ (Příloha 12 – A)
2	‘Large-Cupped Daffodils’ Velkokorunné hybridy	Jeden květ na stonku; prstencovitá pakorunka Pakorunka delší než 1/3 a nedosahuje délky kalichu <i>Narcissus</i> cv. ‘Pacific Rim’ (Příloha 12 – B)
3	‘Small-Cupped Daffodils’ Krátkokorunné hybridy	Jeden květ na stonku; prstencovitá pakorunka Pakorunka kratší než 1/3 délky kalichu <i>Narcissus</i> cv. ‘Emerald Light’ (Příloha 12 – C)
4	‘Double Daffodils’ Plnokvěté hybridy	Jeden nebo víc květů na stonku Zdvojené segmenty koruny nebo kalichu anebo obou <i>Narcissus</i> cv. ‘Rose Garden’ (Příloha 12 – D)
5	‘Triandrus Daffodils’ Triandrus hybridy	Dva nebo víc květů na stonku Kalich je reflektovaný <i>Narcissus</i> cv. ‘Akepa’ (Příloha 12 – E)
6	‘Cyclamineus Daffodils’ Cyclamineus hybridy	Jeden květ na stonku v ostrém uhlu oproti ní Kalich značně reflektovaný <i>Narcissus</i> cv. ‘Saint Louie Louie’ (Příloha 12 – F)
7	‘Jonquilla Daffodils’ Jonquilla hybridy	Jeden–pět květů, výjimečně osm; vonící květy Kalich rozvinutý nebo reflektovaný Pakorunka tvaru ‘trumpet’ nebo ‘cup’ <i>Narcissus</i> cv. ‘Wendover’ (Příloha 12 – G)
8	‘Tazetta Daffodils’ Tazetta hybridy	Tři–dvacet květů na stonku; vonící květy Kalich rozvinutý a nereflektovaný <i>Narcissus</i> cv. ‘Early Pearl’ (Příloha 12 – H)
9	‘Poeticus Daffodils’ Poeticus hybridy	Sněhově bílý květný obal; vonící květy Pakorunka krátká, diskovitá; není delší než 1/5 délky kalichu; je zelená se žlutým centrem a červenou obrubou <i>Narcissus</i> cv. ‘Lemon Cooler’ (Příloha 12 – I)
10	‘Bulbocodium Daffodils’ Bulbocodium hybridy	Jeden květ na stonku Dominantní pakorunka a zanedbatelný kalich Tyčinky jsou charakteristicky zakřiveny <i>Narcissus</i> cv. ‘Cornish Cream’ (Příloha 12 – J)
11a	‘Split-Cupped Collar Daffodils’ Koláry	Segmenty pakorunky rovnoběžně umístěny s kalichem Segmenty pakorunky uloženy ve dvou–tří závitnicích <i>Narcissus</i> cv. ‘Trigonometry’ (Příloha 12 – K)
11b	‘Split-Cupped Papillon Daffodils’ Motýlokvěté hybridy	Střídavé umístění segmentů pakorunky a kalichu Segmenty pakorunky uloženy v jedné závitnici <i>Narcissus</i> cv. ‘Jodi’ (Příloha 12 – L)
12	‘Other Daffodil Cultivars’ Ostatní hybridy	Kultivary nevyhovující předchozím definicím <i>Narcissus</i> cv. ‘Masa Verde’ (Příloha 12 – M)
13	‘Daffodils Distinguished solely by Botanical Name’ Narcisy rozlišovány pouze botanickým názvem	Divoké varianty a hybridy nalezené ve volné přírodě <i>Narcissus rubicola</i> subsp. <i>Watieri</i> (Příloha 12 – N)
	‘Miniature Daffodil’ Miniatury	Opis shodný s jednotlivými divizemi; pouze květ je menší <i>Narcissus</i> cv. ‘Itsy Bitsy Splitsy’ (Příloha 12 – O)

Tabulka 3 – Taxonomické zařazení *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Dutch Master' [19][24][25]

	NÁZEV LATINSKY	NÁZEV ČESKY
IMPERIUM	Eukaryota	Jaderné organismy
REGNUM	Plantae	Rostliny
SUBREGNUM	Viridiplantae	Zelené rostliny
INFRAREGNUM	Streptophyta	Streptofyty
SUPERDIVISIO	Embryophyta	Vyšší rostliny
DIVISIO	Tracheophyta	Cévnaté rostliny
SUBDIVISIO	Spermatophytina	Semenné rostliny
CLASSIS	Magnoliopsida	Nižší dvouděložné rostliny
SUPERORDO	Lilianaes	Jednoděložné rostliny
ORDO	Asparagales	Chřestotvaré
FAMILIA	Amaryllidaceae	Amarylkovité
SUBFAMILIA	Amaryllidoideae	Amarylkové
GENUS	<i>Narcissus</i> L.	Narcis
SECTIO	<i>Pseudonarcissus</i>	-
SPECIES	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	Narcis žlutý
VARIETAS	'Dutch Master'	-

3.2. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

Čeď Amaryllidaceae je bohatým zdrojem biologicky aktivních dusíkatých látek isochinolinové struktury, které souhrnně označujeme termínem alkaloidy čeledi Amaryllidaceae (amarylkovité alkaloidy). Alkaloidy se vyskytují v rámci celých rostlin nicméně hlavním rezervoárem těchto substancí jsou jejich podzemní orgány – cibule, cibulové hlízy nebo oddenky. Popsáno bylo již víc než 600 těchto látek, které se v druzích této čeledi vyskytují jednotlivě nebo kolektivně v různorodých skupinách. Amarylkovité alkaloidy byly podrobeny desítkám až stovkám rozličných studií, které změřili jejich různou biologickou aktivitu. Za zmínění stojí například inhibiční aktivita vůči ChE, antineoplastická, antivirotická, antiprotozoální, antimalarická, antimykotická nebo analgetická aktivita ^{[3][6]}.

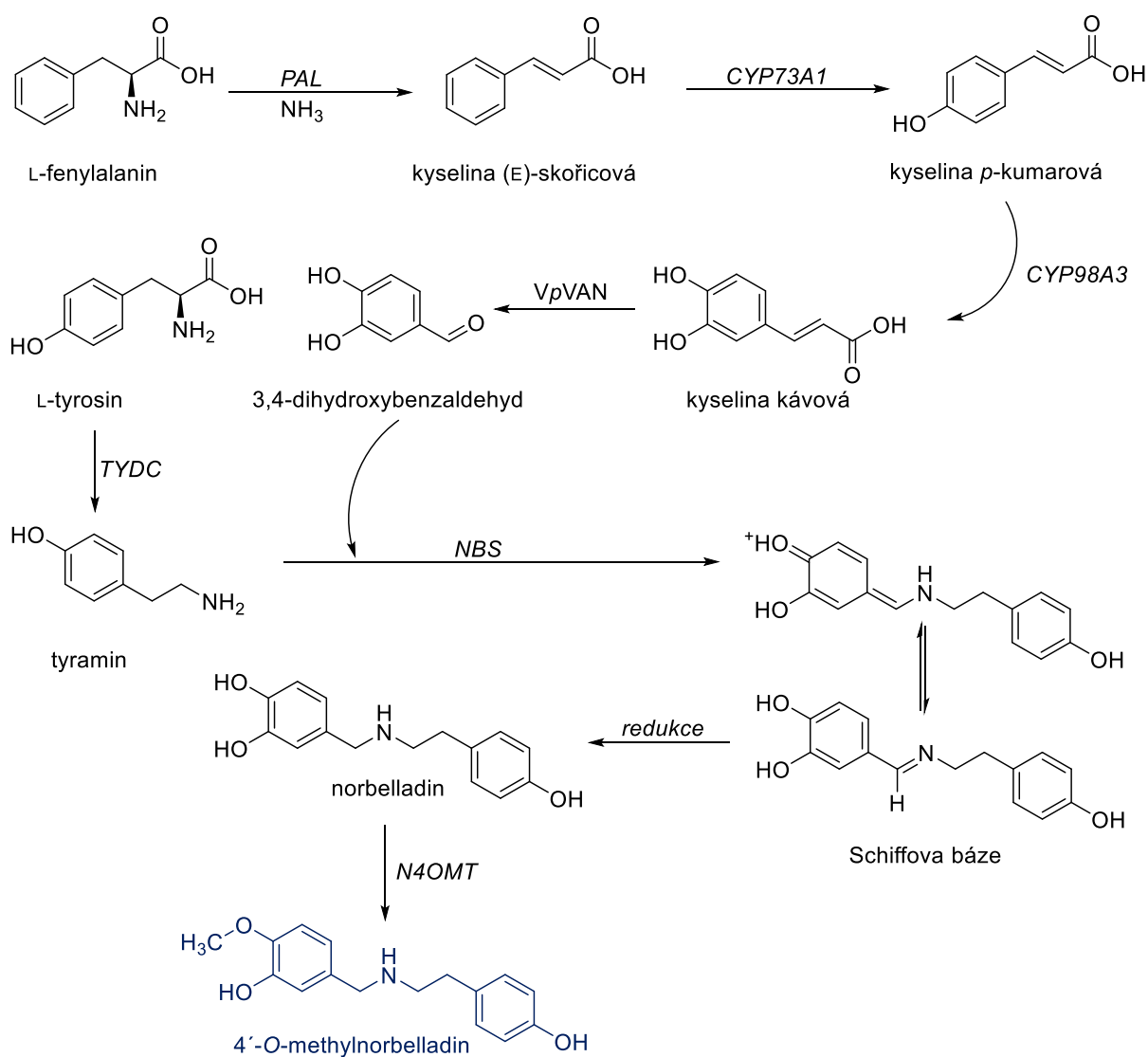
3.2.1. Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů – norbelladinová cesta

Proces biosyntézy amarylkovitých alkaloidů lze, podle přítomných prekurzorů a probíhajících reakcí, rozdělit na pět stupňů. Za první stupeň lze označit tvorbu aminokyselinových jednotek (L-fenylalanin a L-tyrosin) prostřednictvím šikimátové biosyntetické cesty. Druhým stupněm je biosyntéza aldehydové části molekul amarylkovitých alkaloidů (3,4-dihydroxybenzaldehyd), zprostředkovaná pomocí fenylpropanové biosyntetické cesty. Třetí krok můžeme označit za základní (hlavní) stupeň biosyntézy, kdy dochází ke kondenzaci molekuly tyraminu (vzniká dekarboxylací L-tyrosinu pomocí tyrosin dekarboxylasy – *TYDC*) a 3,4-dihydroxybenzaldehydu za vzniku molekuly 4'-*O*-methylnorbelladinu, který je ve čtvrtém stupni cyklizován intramolekulárním oxidačním spojením fenol-fenol ('phenol oxidative coupling') za vzniku nestabilních intermediátu, které v pátém (pozdním) stupni poskytují jednotlivé alkaloidy. Pátý stupeň biosyntézy může probíhat u jednotlivých druhů čeledi Amaryllidaceae rozličným mechanismem, přičemž tyto meziprodukty a mechanismy reakcí jsou v literatuře rozličně popisovány, a prozatím nebyly plně objasněny ^[5]. Konkrétní kroky prvních tří, biosyntetických stupňů jsou popsány v odstavci níže. Zbylé dva biosyntetické stupně jsou popsány u jednotlivých strukturních typů alkaloidů.

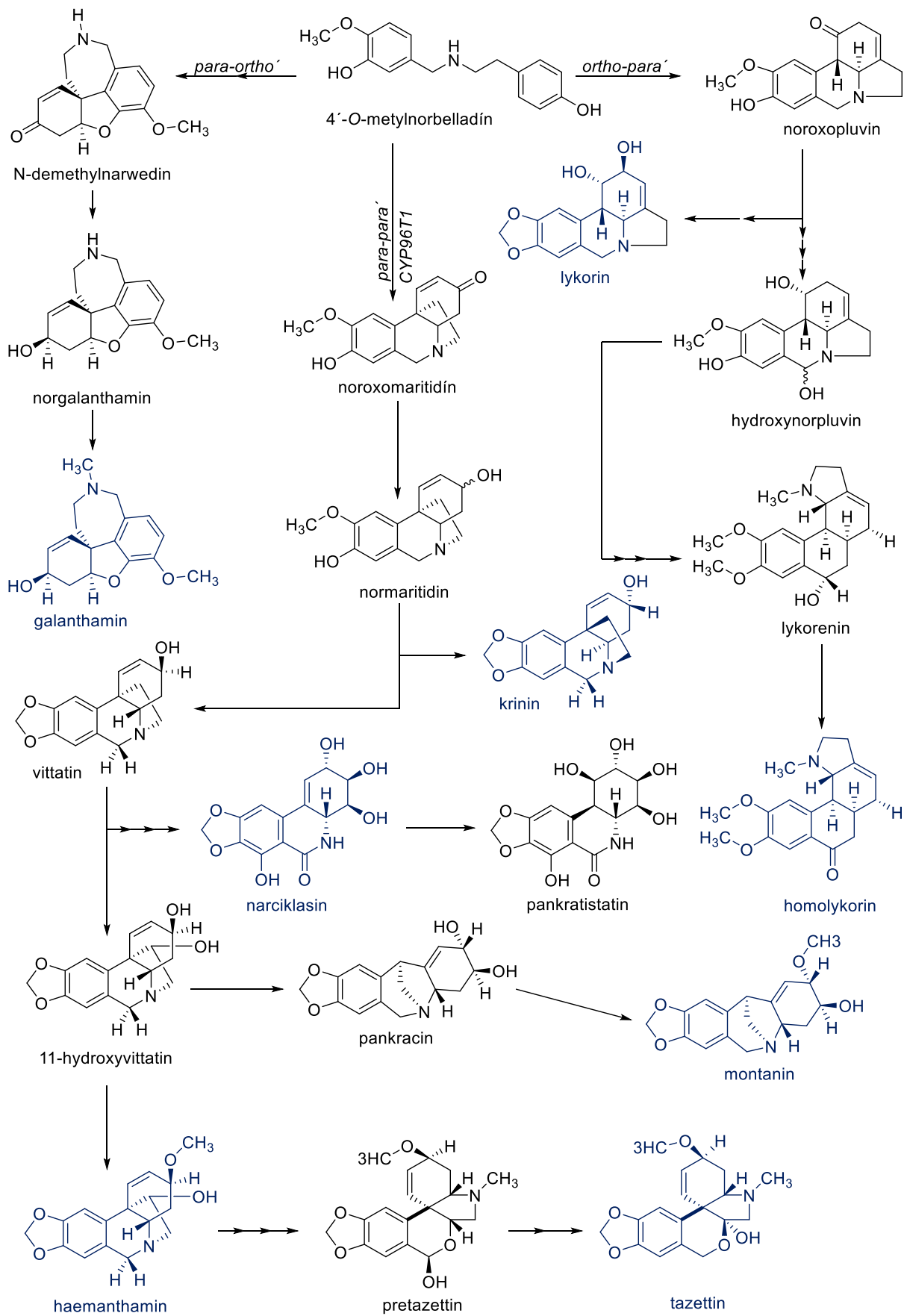
Počátek biosyntézy amarylkovitých alkaloidů se nachází v procesu oxidační deaminace molekuly L-fenylalaninu na kyselinu (E)-skořicovou, která je katalyzována lyasou *PAL* (fenylalaninamonium lyasa). Kyselina (E)-skořicová je následně transformována pomocí cytochromu *CYP73A1* (trans-cinamát-4-monooxygenasa), na kyselinu *p*-kumarovou z které prostřednictvím cytochromu *CYP98A3* vzniká kyselina kávová nebo 4-hydroxybenzaldehyd. Kyselina kávová je prostřednictvím homologu lyasy *VpVAN* (vanilin syntasa) transformována na 3,4-dihydroxybenzaldehyd, který je společně s tyraminem kondenzován na sloučeninu typu Schiffovy báze. Tuto kondenzaci katalyzuje enzym *NBS* (norbelladin syntasa). Shiffova báze je následně pomocí neznáme reductasy redukována na norbelladin. V následujícím kroku je norbelladin metylován pomocí transferasy *N4OMT* (norbelladin

4'-O-methyltransferasa) na 4'-O-methylnorbelladin (klíčový produkt biosyntézy amarylkovitých alkaloidů) [3][5][26][27]. Biosyntéza 4'-O-methylnorbelladinu je uvedena na Obrázek 1.

4'-O-Methylnorbelladin je cyklizován prostřednictvím ('phenol oxidative coupling'), za vzniku kovalentní vazby C-C, a to způsobem *ortho-para'*, *para-ortho'* a *para-para'*. Intramolekulární cyklizace způsobem *para-para'* je katalyzována oxidoreduktasou CYP96T1 (noroxomaritidin syntasa). Zbylé dva způsoby cyklizace jsou katalyzovány doposud neznámým cytochromem. Cyklizace způsobem *ortho-para'* vede ke vzniku skeletu lykorinového a homolykorinového (lykoreninového) typu, způsobem *para-ortho'* ke skeletu galanthaminového typu a způsobem *para-para'* k alkaloidům krininového, haemanthaminového, narciklasinového, tazzetinového a montaninového strukturního typu [3][5][26][27]. Biosyntéza všech hlavních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů je uvedena na – Obrázek 2.



Obrázek 1 – Biosyntéza hlavního prekurzoru amarylkovitých alkaloidů [3][5][26][27]

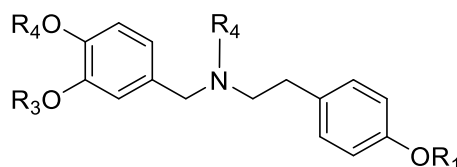


Obrázek 2 – Biosyntéza hlavních strukturálních typů amarylkovitých alkaloidů [3][5][26][27]

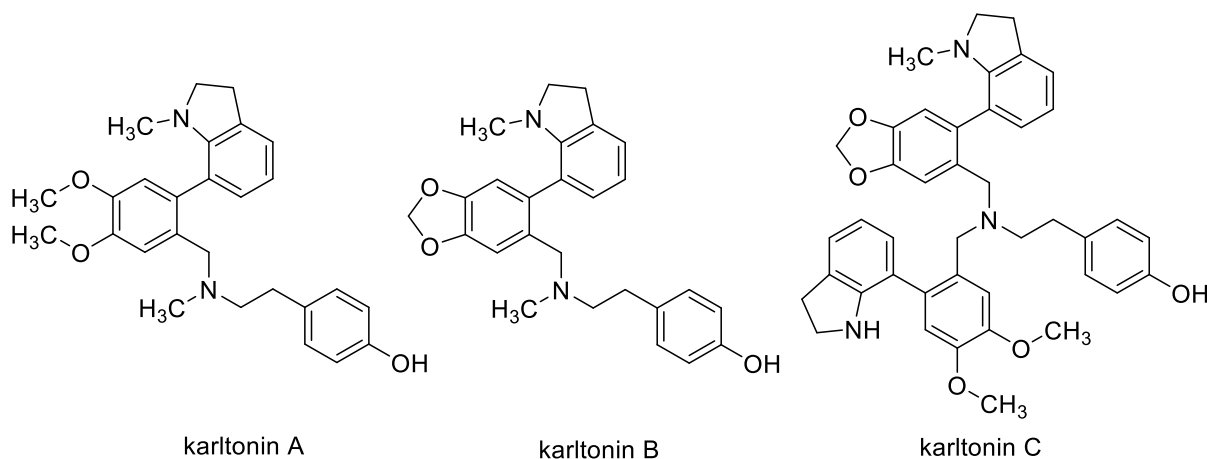
3.2.2. Struktura a biologická aktivita amarylkovitých alkaloidů

3.2.2.1. Skupina alkaloidů belladinového typu

Nepřítomnost heterocyklicky vázaného dusíku v molekulách těchto alkaloidů je klasifikuje do skupiny alkaloidů nazývaných protoalkaloidy. Jejich struktura je odvozena od substituovaného *N*-benzyl-2-fenylethan-1-aminu.



ALKALOID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
BELLADIN	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
NORBELLADIN	H	H	H	H
<i>N</i> -DEMETHYLBELLADIN	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
4'- <i>O</i> -METHYLNORBELLADIN	H	H	H	CH ₃



Obrázek 3 – Belladinový strukturní typ a jeho zástupci [28][29]

Při fytochemické studii druhu *Amaryllis belladonna* L. (Amaryllidaceae) byly z její cibulí izolovány čtyři alkaloidy, z čeho jeden byl alkaloid belladinového typu – belladin. Následně byly alkaloidy podrobeny *in vitro* testu na inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase druhu *Electrophorus electricus* L. (*eeAChE*) za použití galanthaminu (IC_{50} $6,19 \pm 2,60 \mu\text{M}$) jako standardu [30]. Fytochemická studie druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Carlton', prokázala přítomnost tří nových alkaloidních substancí belladinového typu. Jedná se o karltonin A, karltonin B a karltonin C, které byly následně podrobeny *in vitro* testům na inhibiční aktivitu vůči lidské acetylcholinesterase (*huAChE*; standardy galanthamin – *huAChE* IC_{50} $1,72 \pm 0,12 \mu\text{M}$ a fysostigmin – *huAChE* IC_{50} $0,063 \pm 0,005 \mu\text{M}$) a lidské butyrylcholinesterase (*huBChE*; standardy galanthamin – *huBChE* IC_{50} $42 \pm 1 \mu\text{M}$ a fysostigmin – *huBChE* IC_{50} $0,13 \pm 0,01 \mu\text{M}$). U karltoninu A a karltoninu B byla touto studií prokázána značná aktivita a selektivita vůči *huBChE* [29]. Všechny testy vůči ChE probíhali kolorimetrickou metodou podle George L.

Ellmana nebo její modifikovanou verzí. Hodnoty inhibičních aktivit všech látek jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50} [μ M] a jsou uvedeny v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám* ^{[29][30]}.

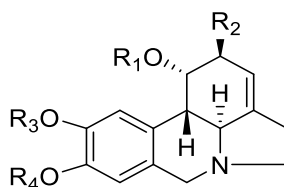
V roce 2014 proběhla studie zaměřená na protizánětlivé účinky norbelladinu vůči reaktivním formám kyslíku, které můžou pomocí aktivace NF- κ B (nukleární faktor kappa B) spustit transkripci genů kódujících proteiny spřažené se zánětlivým procesem jako například cyklooxygenasa 2. Po prokázání jeho scavengerové aktivity cestou oxidace DPPH (2,2-difenyyl-1-pikryl-hydrazyl) radikálu, byla zkoumána jeho aktivita vůči enzymu xanthinoxidasa, která je schopna při oxidaci hypoxanthinu na kyselinu močovou produkovat reaktivní formy kyslíku. Test prokázal schopnost norbelladinu snížit množství reaktivních forem kyslíku o 33 % a to již v 10 μ M koncentraci. Nakonec byl testován jeho inhibiční účinek vůči cyklooxygenase 1 (standard aspirin) a cyklooxygenase 2 (standard NS-398). Studie prokázala, že norbelladin v koncentraci 0,25 μ M vykazuje vyšší inhibiční potenciál vůči cyklooxygenase 1 (51 %) a srovnatelný inhibiční potenciál vůči cyklooxygenase 2 (25 %) v porovnání se standardy ^[31].

3.2.2.2. Skupina alkaloidů lykorinového typu

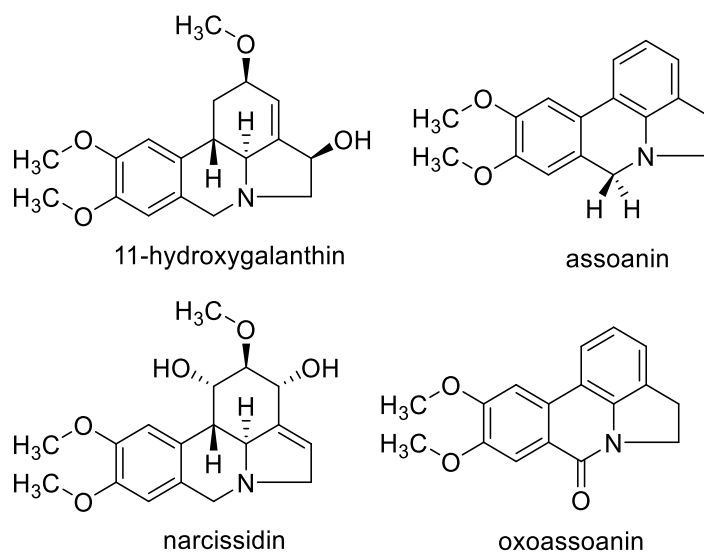
Mezi hlavního zástupce této skupiny patří alkaloid lykorin, který byl izolován v roce 1877, z druhu *Narcissus pseudonarcissus* L., jako vůbec první zástupce alkaloidů této čeledi. Základním strukturním rysem, jak lykorinu, tak celé skupiny lykorinových alkaloidů, je přítomnost pyrrolo[d.e]fenanthridinového jádra, které vzniká prostřednictvím 'phenol oxidative coupling' typu *ortho – para'* z prekursoru 4'-*O*-methylnorbelladinu ^{[3][32]}. Ten je transformován na molekulu noroxopluiinu, který je následně redukován na norpluiin. Z něj je, pomocí methylenového můstku, formován 1,3-dioxolanový cyklus a vzniká molekula karaninu, který je následně hydroxylován za vzniku lykorinu ^[5]. Zástupci homolykorinového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na [Obrázek 4](#).

Alkaloidy lykorinového strukturního typu nevykazují dobré inhibiční vlastnosti vůči ChE. Potvrdilo to například testování inhibičních vlastností assoaninu a oxoassoaninu vůči *eeAChE*. Za standard byl zvolen galanthamin (IC_{50} 1,07 \pm 0,18 μ M) ^[33]. Inhibiční vlastnosti vůči ChE byly testovány také u 11-hydroxygalanthinu, narcissidinu a pseudolykorinu. Byla použita *eeAChE* a *BChE* druhu *Equus f. caballus* L. (*eqBChE*). Za standard byl zvolen galanthamin (*eeAChE* – IC_{50} 0,15 μ M; *eqBChE* – IC_{50} 2,47 μ M) ^[34]. Ani testování acetylkaraninu, galanthinu, karaninu, lykorinu a *O*-acetylpluiinu nepřineslo slibné výsledky. Při testování aktivity lykorinu vůči *AChE* (původ neznámy) byl za standard zvolen fysostigmin (IC_{50} 0,25 μ M). Aktivita galanthinu, karaninu a *O*-acetylpluiinu byla testována na *huAChE* a *huBChE* a jako standard byl zvolen galanthamin (*huAChE* – IC_{50} 1,70 \pm 0,10 μ M; *huBChE* – IC_{50} 42,30 \pm 1,30 μ M)

a Huperzin A (*huAChE* – IC_{50} $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$; *huBChE* – $IC_{50} > 500 \mu\text{M}$). Acetylkarantin byl testován vůči *eeAChE* a jako standard byl zvolen galanthamin (IC_{50} $6,19 \pm 2,60 \mu\text{M}$)^{[30][35][36]}. Všechny testy vůči ChE probíhali kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana nebo její modifikovanou verzí. Hodnoty inhibičních aktivit všech látek jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50} [μM] a jsou uvedeny v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám*^{[30][33][34][35][36]}.



ALKALOID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ACETYLKARANTIN	CH ₃ CO	H		CH ₂
GALANTHIN	H	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
JONQUILLIN	CH ₃ CO	O		CH ₂
KARANTIN	H	H		CH ₂
LYKORIN	H	OH		CH ₂
O-ACETYLPLUVIIN	CH ₃ CO	H	CH ₃	CH ₃
PSEUDOLYKORIN	H	OH	H	CH ₃



Obrázek 4 – Lykorinový strukturní typ a jeho zástupci^{[30][32][34][36]}

Alkaloidy lykorinového skeletu patří z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším amarylkovitým alkaloidům. Protinádorová aktivita lykorinu byla prokázána *in vivo* u myšního melanomu L6, Lewisova plicního karcinomu a *in vitro* například na buněčných liniích HeLa, K562, BCA-1, HT-1080, LUC-1, COL-2, KB, KB-V, P-388, A-431, LNCaP a ZR-75-1^{[3][37]}. Značnou cytotoxicitu lykorinu prokázal také screening amarylkovitých alkaloidů z roku 2017. Testovaných bylo celkem dvacet dva těchto alkaloidů, přičemž lykorin, haemanthamin a haemanthidin se prokázaly jako nejvíce cytotoxické.

Testování proběhlo na panelu šestnácti nádorových buněčných liniích – HL-60, Jurkat, MOLT-4, A549, H1299, COLO-201, HT-29, SW-480, AGS, PANC-1, A2780, HeLa, BT-549, MCF-7, MDA-MB-231, SAOS-2 a pro porovnání cytotoxicity vůči nenádorovým buňkám byly zvoleny zdravé lidské kožní fibroblasty – NHDF. Výsledky testování a porovnání všech tří nejvíce cytotoxických alkaloidů uvádí **Tabulka 6** v podkapitole *Skupina alkaloidů haemanthaminového a krininového typu* [38]. Studie z roku 2019 prokázala antiproliferační a proapoptotický účinek lykorin u NSCLC prostřednictvím up-regulace genové exprese miR-186³, které účinek je namířen proti kinase CDK1 (cyklin-dependentní kinasa 1; byl prokázán její zvýšený výskyt v nádorových buňkách) [39]. Další studie lykorinu prokázala jeho schopnost inkorporovat se do molekul cyklodextrinů, jako molekulárních nosičů, a tím zvýšit jeho rozpustnost ve vodě, termostabilitu a cytotoxicitu. Cytotoxicita lykorinu a jeho molekulárních komplexů byla testována na nádorových liniích HT-29, DLD-1, SW480 a HCT116 a za standard cytotoxicity byla zvolena cisplatina. Ze studie plyne, že samotný lykorin vykazuje vyšší cytotoxicitu než cisplatina. Dále bylo pozorováno že, dva ze tří molekulárních lykorinových komplexů prokázali signifikantní zvýšení cytotoxicity v porovnání ze samotným lykorinem nebo cisplatinou – **Tabulka 4** [40].

Tabulka 4 – Přehled IC₅₀ lykorinu a jeho molekulárních komplexů vůči lidským nádorovým kulturám [40]

FORMA LYKORINU	IC ₅₀ [μM]			
	HT29	SW480	HCT116	DLD-1
LYKORIN	3,35	4,47	2,93	3,75
LYKORIN + α-CYKLODEXTRIN	0,16	0,31	0,17	0,30
LYKORIN + β-CYKLODEXTRIN	0,29	0,43	0,24	0,27
LYKORIN + γ-CYKLODEXTRIN	3,38	4,08	3,47	3,99
CISPLATINA	4,46	9,47	4,30	4,48

Studie z roku 2020 prokázala aktivitu lykorinu vůči viru ZIKA. Jedná se o RNA vir z čeledi Flaviviridae, prvně objeven v ugandském dešťovém pralese Ziika v roce 1947 u primáta *Macaca mulatta* (Cercopithecidae). Jako hostitelské buňky pro *in vitro* testy byly zvoleny zdravé ledvinné buňky primáta z rodu *Chlorocebus* Gray (Cercopithecidae) – Vero a nádorové linie Huh7 a A549. Jako pozitivní standard byl zvolen brequinar (selektivní inhibitor dihydroorotát dehydrogenasy, blokující syntézu pyrimidinu). Antivirová aktivita lykorinu a brequinaru je vyjádřena jako EC₅₀ [μM] a jejich cytotoxická koncentrace jako CC₅₀ [μM]. Pomocí nástrojů molekulární genetiky bylo zjištěno že, inhibiční schopnost lykorinu na replikaci ZIKA viru je způsobena ovlivněním jeho RNA-dependentní RNA polymerasy. Aktivita lykorinu byla dále testována také na *in vivo* infikovaném myším modelu, kde se opětovně

³ microRNA-186 je krátká nukleotidová sekvence, která se váže na specifické místo genu pro CDK1 a způsobuje down-regulaci exprese proteinu CDK1 v NSCLC buňkách [39].

prokázala jeho schopnost potlačit replikaci ZIKA viru ^[41]. Výsledky CC₅₀ a EC₅₀ lykorinu a brequinaru vůči testovaným buněčným liniím jsou uvedeny v [Tabulka 5](#).

Mimo antineoplastickou a antivirovou aktivitu, je lykorin také silným inhibítozem enzymu L-galaktono- γ -lakton dehydrogenasa. Tato oxidoreduktasa katalyzuje finální proměnu sloučeniny L-galaktono-1,4-lakton na kyselinu L-askorbovou. Při *in vivo* studii na myším a potkaním modelu vykazoval lykorin také hepatoprotektivní, analgetické a antioxidační účinky ^{[3][32][42]}.

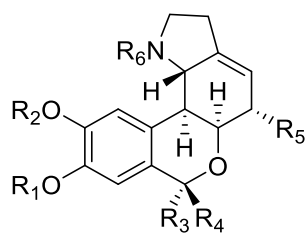
Tabulka 5 – Antivirová aktivita lykorinu vůči viru ZIKA ^[41]

BUŇKY	CC ₅₀ [μM]		EC ₅₀ [μM]	
	LYKORIN	BREQUINAR	LYKORIN	BREQUINAR
VERO	21	> 50	0,39	0,022
HUH7	4,40	> 50	0,22	0,006
A549	4,29	> 50	0,22	0,046

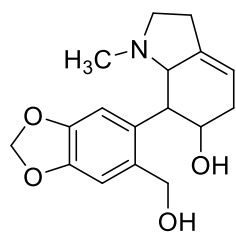
3.2.2.3. Skupina alkaloidů homolykorinového typu

Alkaloidní skelet této skupiny má základ v substituovaném 2-benzopyrano-[3.4-g] indolovém jádru, vznikajícím při 'phenol oxidative coupling' cestou *ortho-para'* z 4'-O-methylnorbelladinu. Ten je transformován na molekulu noroxopluiinu, který je dále redukován na norpluiin. Norpluiin je následně oxidován (hydroxylace) na hydroxynorpluiin. Nově vzniklá hydroxylová skupina je opětovně oxidována, a za současného otevření kruhu vzniká sloučenina povahy aminoaldehydu. Dále následuje proces intramolekulární rotace a tvorby hemiacetalové vazby, čím se zformuje nový kruh. Nově vzniklá molekula je následně methylována na alkaloid lykorenin a ten je redukován na homolykorin ^{[27][31][43]}. Někteří autoři pojmenovávají tento strukturní typ jako lykoreninový, zřejmě z důvodu přítomnosti lykoreninu jako prekursoru homolykorinu. Zástupci homolykorinového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na [Obrázek 5](#).

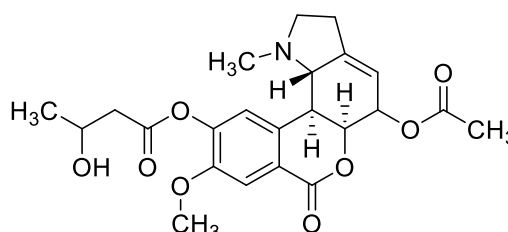
Podobně jako tomu bylo u lykorinových alkaloidů, ani ty homolykorinové nevykazují dobré inhibiční aktivity vůči lidským ChE. Kromě dubiusinu, byla inhibiční aktivita všech alkaloidů na [Obrázek 5](#) testována vůči *huAChE* a *huBChE* a jako standard byl zvolen galanthamin (*huAChE* – IC₅₀ 1,70 ± 0,10 μM; *huBChE* – IC₅₀ 42,30 ± 1,30 μM) a Huperzin A (*huAChE* – IC₅₀ 0,033 ± 0,001 μM; *huBChE* – IC₅₀ > 500 μM) ^[36]. Při fytochemickém screeningu tureckého *Galanthus alpinus* Sons. var. *alpinus* (Amaryllidaceae) byl izolován homolykorin a následně testován vůči *eeAChE* a *eqBChE*. Za standard byl zvolen galanthamin (*huAChE* – IC₅₀ 0,15 μM; *huBChE* – IC₅₀ 2,47 μM) ^[44]. Všechny inhibiční testy vůči ChE probíhaly kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana nebo její modifikovanou verzí. Hodnoty inhibičních aktivit všech látek jsou vyjádřeny jako hodnota IC₅₀ [μM] a jsou uvedeny v podkapitole [Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasam](#) ^{[33][36][44]}.



ALKALOID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
HIPPEASTRIN		CH ₂		O	OH	CH ₃
HOMOLYKORIN	CH ₃	CH ₃		O	H	CH ₃
LYKORENIN	CH ₃	CH ₃	OH	H	H	CH ₃
MASONIN		CH ₂		O	H	CH ₃
NORMASONIN		CH ₂		O	H	H
ODULIN		CH ₂	OH	H	H	CH ₃
O-ETHYLLYKORENIN	CH ₃	CH ₃	OC ₂ H ₅	H	H	CH ₃
O-METHYLLYKORENIN	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	H	H	CH ₃



tetrahydromasonin



dubiusin

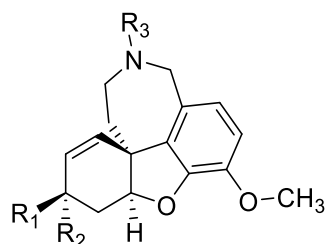
Obrázek 5 – Homolykorinový strukturní typ a jeho zástupci [32][36]

Alkaloidy dubiusin, hippeastrin, homolykorin a lykorenin vykazují značné cytotoxické vlastnosti vůči nádorovým buňkám LMTK, MOLT-4, HepG2, LNCaP, avšak jejich potenciálnímu využití jako nových cytostatik brání jejich výrazní cytotoxicita vůči lidským nenádorovým buňkám. Z dalších účinku homolykorinových alkaloidů lze uvést například hypotenzní účinky u dubiusinu, homolykorinu a lykoreninu. Lykorenin navíc vykazuje také vasodilatační účinky, které jsou připisovány jeho α -adrenolytickému působení a také je schopen vyvolat bradykardii modulací aktivity bloudivého nervu. U hippeastrinu byla mimo jeho antineoplastického působení prokázána také antivirotická aktivita vůči *Herpes simplex* viru typu 1 (Herpesviridae) a aktivita antimykotická vůči kvasince *Candida albicans* (Saccharomycetaceae) [3][27].

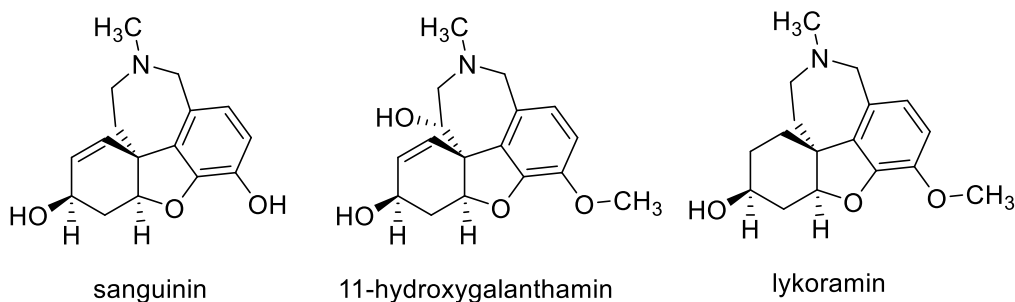
3.2.2.4. Skupina alkaloidů galanthaminového typu

Jak již z názvu strukturního typu plyne, patří galanthamin mezi hlavní zástupce této skupiny alkaloidů. Prvně byl izolován roku 1940 z rostlinného druhu *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae). Galanthaminový strukturní typ alkaloidů je odvozen od substituovaného hexahydro-6H-benzo[2,3]benzofurano[4,3-c,d]azepanového jádra, které vzniká při 'phenol oxidative coupling' typu *para-ortho*' [32]. Jako první krok biosyntézy je popisována cyklizace 4'-O-methylnorbelladinu za vzniku

azepanového cyklu a dienonu, přítomného na jeho fenylethanové části molekuly. Dienon spontánně reaguje s volnou hydroxylovou skupinou benzylové části molekuly 4'-*O*-methylnorbelladinu, čímž vzniká etherový můstek a je vytvořen furanový cyklus. Takle transformace vedla k tvorbě molekuly *N*-demethylnarwedinu, který je po následné stereoselektivní redukci transformován na molekulu norgalanthaminu, a ten je methylován (*N*-methylace) za vzniku molekuly galanthaminu [27]. Zástupci galanthaminového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na následujícím obrázku – **Obrázek 6**.



ALKALOID	R ₁	R ₂	R ₃
EPINORGALANTHAMIN	H	OH	H
GALANTHAMIN	OH	H	CH ₃
NARCISIN	OH	H	CH ₃ CO
NARWEDIN		O	CH ₃
NORGALANTHAMIN	OH	H	H



Obrázek 6 – Galanthaminový strukturní typ a jeho zástupci [32][33][45]

U galanthaminu, lykoraminu a narwedinu byla testována jejich inhibiční aktivita vůči *huAChE* a *huBChE* a za standard byl zvolen galanthamin (*huAChE* – IC₅₀ 1,70 ± 0,10 μM; *huBChE* – IC₅₀ 42,30 ± 1,30 μM) a Huperzin A (*huAChE* – IC₅₀ 0,033 ± 0,001 μM; *huBChE* – IC₅₀ > 500 μM) [36]. Galanthamin byl testován také vůči *eeAChE* a *eqBChE*. Za standard byl zvolen galanthamin (*eeAChE* – IC₅₀ 0,15 μM; *eqBChE* – IC₅₀ 2,47 μM) [34]. Sanguinin, izolovaný z druhu *Crinum jagus* (J.Thomps.) Dandy, byl také testován vůči *AChE* (neznámý původ). Jako standard při testování byl zvolen galanthamin (IC₅₀ 7,50 ± 0,02 μM) [45]. Jiná fytochemická studie testovala inhibiční účinky sanguininu vůči *eeAChE*. Za standard byl zvolen galanthamin (IC₅₀ 1,07 ± 0,18 μM). Ve stejné studii byl testován také 11-hydroxygalanthamin a epinorgalanthamin [33]. Všechny inhibiční testy vůči *ChE* probíhali kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana nebo její modifikovanou verzí. Hodnoty inhibičních

aktivit všech látek jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50} [μM] a jsou uvedeny v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám* ^{[33][36][45]}.

Kromě anticholinesterasových (cholinomimetických) vlastností, vykazuje galanthamin také modulační účinek vůči pre- a postsynaptickým nikotinovým acetylcholinovým receptorům (nAChRs), konkrétně na homomerním $\alpha 7$ a heteromerním $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ nikotinovém receptoru. Modulací těchto receptorů se zvyšuje neuronální neurotransmise, a také se předpokládá protektivní účinek vůči amyloidem β ($A\beta$) vyvolané apoptóze neuronů. Jak tedy z uvedeného plyne, má galanthamin duální efekt (cholinomimetický a nAChRs modulační), což společně s jeho dobrou propustností přes hematoencefalickou bariéru z něj dělá vhodného kandidáta pro léčbu AD ^{[27][46]}.

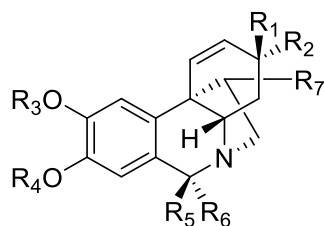
Derivát galanthaminu – sanguinin, vykazuje větší afinitu vázat se na AChE, a tím pádem i jeho cholinomimetický účinek je větší než u galanthaminu⁴. Za příčinu těchto vlastností se předpokládá přítomnost volné hydroxylové skupiny (u galanthaminu nese tato hydroxylová skupina methyl), která může pomocí slabých vazebných interakcí reagovat s molekulou AChE. Naproti sanguininu a galanthaminu nevykazuje alkaloid lykoramin téměř žádnou anticholinesterasovou aktivitu. Předpokládá se, že je to zapříčiněno absencí C3-C4 dvojně vazby v jeho molekule (u galanthaminu a sanguininu je přítomná), čím se vytratila prostorová rigidita molekuly, kterou ji tato vazba poskytovala a otevřela se možnost pro volnou rotaci molekuly kolem jednoduché σ -vazby. Z tohoto důvodu není molekula lykoraminu schopna zaujmout správnou prostorovou konformaci potřebou k interakci s vazebním místem na AChE. Z dalších galanthaminových alkaloidů lze uvést alkaloid narwedín, u kterého byly pozorovány účinky na kardiovaskulární systém – zvýšení srdeční amplitudy a bradykardizující účinek; respirační systém – stimulace ventilace. Dále je také schopen antagonistovat účinek hypnotik a potencovat analgetický účinek morfinu ^[27].

3.2.2.5. Skupina alkaloidů haemanthaminového a krininového typu

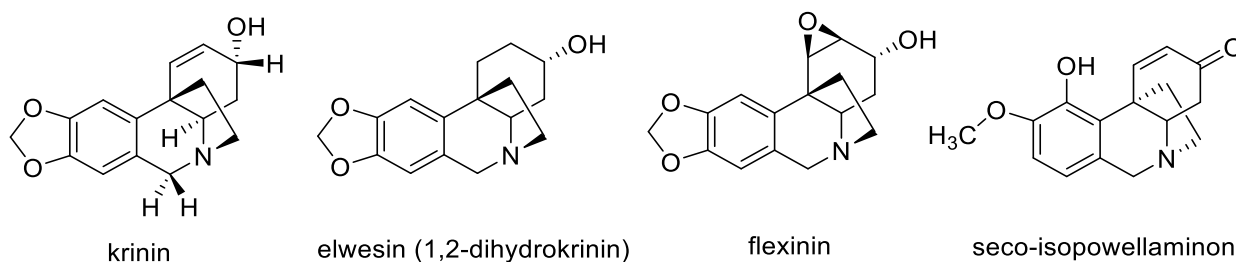
Haemanthaminový a krininový typ alkaloidů je odvozen od 5,10b-ethanofenantridinového jádra ^[32]. Jednu z možných biosyntetických cest alkaloidů haemanthaminového typu popisuje studie z roku 2018 u druhu *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (Amaryllidaceae), která předpokládá biosyntézu těchto alkaloidů cestou *para-para'* 'phenol oxidative coupling', kde se ze 4'-O-methynorbelladinu formuje molekula noroxomaritidinu, který je následně redukován na normaritidin. Ten je pak transformován za vzniku 1,3-dioxolanového cyklu na vittatin, který je následně hydroxylován (12-C-hydroxylace) na 11-hydroxyvittatin. Finálním krokem tvorby haemanthaminu je methylace (3-O-methylace) molekuly 11-hydroxyvittatinu ^[26]. Biosyntéza krininového typu alkaloidů vychází

⁴ Popisuje se až desetkrát větší vazební afinita na AChE a cholinomimetický účinek oproti galanthaminu ^[27].

z normaritudinu, který je transformován za vzniku 1,3-dioxolanového cyklu na krinin⁵ [27]. Zástupci haemanthaminového a krininového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na následujícím obrázku – Obrázek 7.



ALKALOID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
EPIMARITIDIN	H	OH	CH ₃	CH ₃	H	H	H
HAEMANTHAMIN	OCH ₃	H		CH ₂	H	H	OH
HAEMANTHIDIN	OCH ₃	H		CH ₂	H	OH	OH
KRINAMIN	H	OCH ₃		CH ₂	H	H	OH
MARITIDIN	OH	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H
PAPYRAMIN	OCH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	OH	H
VITTATIN	OH	H		CH ₂	H	H	H



Obrázek 7 – Haemanthaminový a krininový strukturní typ a jejich zástupci [32][36][45][47]

Krinin a flexinin, izolovány při fytochemické studii druhu *Crinum jagus* (J.Thomps.) Dandy (Amaryllidaceae), byly rovněž testovány vůči AChE (neznámý původ). Jako standard při testování byl zvolen galanthamin (IC_{50} 7,50 ± 0,02 μM) [45]. Krinin byl testován také ve fytochemické studii druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. ‘Dutch Master’. Testování proběhlo vůči *huAChE* a *huBChE* a za standard byl zvolen galanthamin (*huAChE* – IC_{50} 1,70 ± 0,10 μM; *huBChE* – IC_{50} 42,30 ± 1,30 μM) a Huperzin A (*huAChE* – IC_{50} 0,033 ± 0,001 μM; *huBChE* – IC_{50} > 500 μM). Ve stejné studii proběhlo také testování epimaritudinu, haemanthaminu a seco-isopowellaminonu [36]. Všechny inhibiční testy vůči ChE probíhali kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana nebo její modifikovanou verzí. Hodnoty inhibičních aktivit všech látek jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50} [μM] a jsou uvedeny v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám* [36][45].

⁵ Vittatin a krinin jsou enantiomery – jejich základ tvoří enantiomerní 5,10b-ethanofenantridinové jádro. Pro porovnání jejich struktur viz. Obrázek 2 nebo Obrázek 7.

Jak již bylo zmíněno v podkapitole *Skupina alkaloidů lykorinového typu*, byly lykorin, haemanthamin a haemanthidin podrobeny *in vitro* cytotoxickému screeningu na panelu šestnácti linií nádorových buněk. Studie prokázala jejich značnou cytotoxicitu⁶ vůči všem nádorovým liniím. Cytotoxická aktivita je vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μM] a je uvedená v **Tabulka 6**. Ve stejné studii byl testován také krinin, který po porovnání se standardem (doxorubicin)⁷, neprokázal téměř žádnou cytotoxicitu vůči testovaným nádorovým liniím (viabilita buněk vystavených krininu se pohybovala v rozmezí 85 – 115 %) [38].

Tabulka 6 – Přehled IC₅₀ lykorinu, haemanthaminu a haemanthidinu vůči lidským nádorovým kulturám [38]

BUNĚČNÁ LINIE	IC ₅₀ [μM]		
	HAEMANTHAMIN	HAEMANTHIDIN	LYKORIN
HL-60	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1
JURKAT	1,4 ± 0,3	9,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1
MOLT-4	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2
A549	1,1 ± 0,2	9,6 ± 0,0	1,0 ± 0,1
H1229	1,2 ± 0,2	9,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2
COLO-201	1,0 ± 0,1	9,3 ± 0,3	0,8 ± 0,2
HT-29	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,3
SW-480	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,3
AGS	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,8 ± 0,3
PANC-1	9,8 ± 0,4	9,7 ± 0,2	0,7 ± 0,4
A2780	0,7 ± 0,4	2,3 ± 0,4	1,2 ± 0,1
HELA	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,9 ± 0,3
BT-549	1,0 ± 0,2	9,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2
MCF-7	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,8 ± 0,5
MDA-MB-321	9,5 ± 0,2	8,5 ± 1,0	1,4 ± 0,2
SAOS-02	1,1 ± 0,4	9,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4
NHDF	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,4	0,8 ± 0,3

Krinin a elwesin byly také testovány vůči lidským nádorovým buňkám. Pro testování byly zvoleny nádorové buněčné kultury SKW-3, HL-60, HL-60/Dox, MDA-MB-231 a jako standard byl zvolen topotekan (derivát kamptotecinu; inhibitor topoisomerasy I). Cytotoxická aktivita je vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μM] a je uvedená v tabulce. I přesto, že screening neprokázal dobré protinádorové účinky těchto alkaloidů, tak poukázal na určitý vztah mezi strukturou a cytotoxickým účinkem těchto alkaloidních struktur – krinin vs. jeho hydrogenovaný protějšek elwesin [47]. Porovnání hodnot IC₅₀ krininu, elwesinu a topotekanu vůči nádorovým liniím je uvedeno v **Tabulka 7**. Také krinamin, maritidin a papyramin vykazují antineoplastickou aktivitu. Jejich aktivita byla prokázala u linií nádorových buněk MOLT-4, BL-6, HepG2 a LNCaP [27].

⁶ Předpokládaný mechanismus cytotoxického účinku haemanthaminu tkví v blokaci vazebného místa pro peptidyltranserasu na 60S ribozomální podjednotce, čímž je znemožněna elongace polypeptidového řetězce nově vznikajícího peptidu [27].

⁷ Viabilita buněk vystavených doxorubicinu se pohybovala v rozmezí 2 – 63 % [38].

Z dalších účinků těchto alkaloidů lze zmínit například schopnost krinaminu inhibovat produkci oxidu dusnatého, antimalarickou aktivitu haemanthaminu, haemanthidinu a krinaminu vůči chlorochin rezistentnímu kmenu *Plasmodium falciparum* (Plasmodiidae) a hypotenzní účinky u papyraminu. Nelze také opomenout antibakteriální účinky vittatinu vůči *Staphylococcus aureus* (Staphylococcaceae) a *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) a krinaminu vůči *Bacillus subtilis* (Bacillaceae) a *Staphylococcus aureus* (Staphylococcaceae) [27].

Tabulka 7 – Přehled IC_{50} krininu a elwesinu vůči lidským nádorovým kulturám [47]

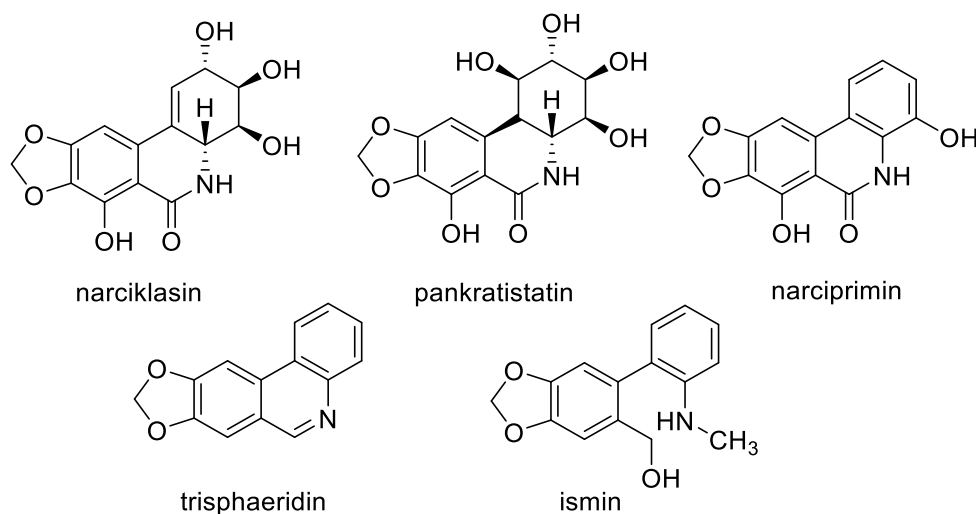
ALKALOID	IC_{50} [μ M]			
	SKW-3	HL-60	HL-60/Dox	MDA-MB-231
KRININ	16,95 \pm 6,56	20,86 \pm 1,59	14,04 \pm 1,34	68,11 \pm 7,78
ELWESIN	> 100,00	> 100,00	> 100,00	> 100,00
TOPOTEKAN	0,27 \pm 0,07	0,17 \pm 0,04	0,24 \pm 0,06	0,35 \pm 0,11

3.2.2.6. Skupina alkaloidů narciklasinového typu

Základním strukturním prvkem narciklasinových alkaloidů je přítomnost fenantridinového jádra, které je dále substituováno. Biosyntéza této skupiny alkaloidů nebyla doposud plně objasněna. Částečně můžeme biosyntézu těchto alkaloidů nalézt v studii druhu *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (Amaryllidaceae) z roku 2018, která popisuje biosyntézu vittatinu [26], jako jednoho z možných prekurzorů těchto alkaloidů [5]. Biosyntéza vittatinu je popsána v podkapitole *Skupina alkaloidů haemanthaminového a krininového typu*. Za další krok biosyntézy těchto alkaloidů se popisuje přeskupení 5,10b-ethanofenantridinového jádra vittatinu na jádro fenanthridinové, které je následně v několika krocích hydroxylováno a redukováno na narciklasin, který může být pak hydroxylován na pankratistatin [5]. Někteří autoři označují za prekurzor této alkaloidní skupiny alkaloid krinin, což vzhledem na enantiomerní povahu krininu a vittatinu nemusí být vcelku chybná hypotéza [27]. Jiná literatura zas za biologický prekurzor narciklasinu označuje 11-hydroxyvittatin, který eliminuje svůj ethanový můstek prostřednictvím retro-Prinsové reakce za vzniku intermediátu, který je následně v několika krocích redukováno a hydroxylováno na narciklasin [48]. Zástupci narciklasinového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na [Obrázek 8](#).

Studie druhu *Cyrthantus contractus* N.E.Br. (Amaryllidaceae) prokázala v jeho cibulích přítomnost alkaloidu narcipriminu, který byl následně podroben *in vitro* inhibičním testům vůči eeAChE za použití galanthaminu (IC_{50} 1,9 \pm 0,16 μ M) jako standardu [50]. Studie cibulí rostlinného druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Carlton' zas prokázala přítomnost dalšího narciklasinového alkaloidu trisphaeridinu, který byl následně testován na inhibiční aktivitu vůči huAChE (standardy galanthamin – huAChE IC_{50} 1,72 \pm 0,12 μ M a fysostigmin – huAChE IC_{50} 0,063 \pm 0,005 μ M) a huBChE (standardy galanthamin – huBChE IC_{50} 42 \pm 1 μ M a fysostigmin – huBChE IC_{50} 0,13 \pm 0,01 μ M) [29]. Všechny inhibiční

testy vůči ChE probíhali kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana a hodnoty inhibičních aktivit jsou vyjádřeny jako hodnota IC_{50} [μM] a jsou uvedeny v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám* [29][50].



Obrázek 8 – Narciklasinový strukturní typ a jeho zástupci [32][49]

Fytochemická studie druhu *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae) z roku 2019 prokázala u narciklasinu, izolovaného z tohoto druhu, schopnost inhibovat aktivaci NF- κ B (nukleární faktor kappa B) a fosforylaci MAPK (mitogenem aktivovaná proteinová kinasa), čehož výsledkem je suprese tvorby některých cytokinů – interleukin 6, tumor nekrotizující faktor α a interleukin 1 β . V konečném důsledku prokázala tato studie protizánětlivý efekt narciklasinu, který může být v budoucnu potenciálně využit pro terapii rozličných onemocnění asociovaných se zánětlivým procesem. Ve stejné studii byly prokázány také jeho cytotoxické vlastnosti vůči některým nádorovým liniím – HepG2 (IC_{50} 0,08 μM), HT-29 (IC_{50} 1,373 μM), L02 (IC_{50} 0,09 μM) a RAW264.7 (IC_{50} 0,055 μM) [51]. Dále byla u narciklasinu popsána aktivita antimitotická prostřednictvím inhibice proteosyntézy⁸ v M-fázi buněčného cyklu [27].

Mimo výše uvedené účinky narciklasinu je prokázán také jeho adjuvantní účinky při léčbě artritidy (prokázáno *in vivo* u myšičího modelu), antibakteriální účinek vůči *Corynebacterium fascians* (Nocardiaceae) a antivirotické vůči RNA virům z čeledi Flaviviridae a Bunyaviridae. Navíc je narciklasin, stejně jako lykorin, schopen potlačit tvorbu kyseliny L-askorbové, inhibovat gibereliny indukovanou produkci α -amylasy u ječmene, prostřednictvím inhibice proteas oddálit stárnutí řezaných květů kosatce a také inhibovat enzymy isocitratlyasa (přítomná v glyoxysomech) a hydroxypyruvat reduktasa (přítomná v peroxisomech) [27]. Mezi další účinky, potenciálně využitelné při terapii nádorových

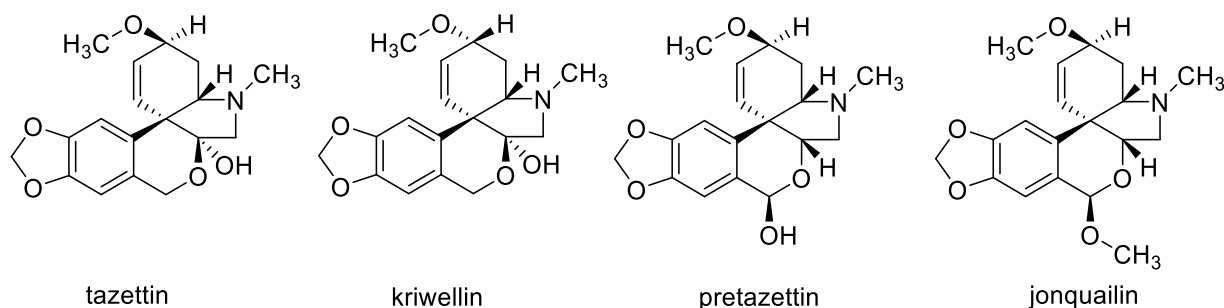
⁸ Narciklasin interaguje s 60S ribozomální podjednotkou a zabraňuje inkorporaci další aminokyselinové jednotky na 3' konec nově vznikajícího polypeptidového řetězce v katalytickém místě peptidyltransferasy [27].

onemocnění, patří inhibice angiogeneze prostřednictvím snížení množství VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), RhoA (Ras homolog člen rodiny A) a down regulací VEGFR-2 (receptor pro endoteliální růstový faktor typu 2). Tyto účinky byly prokázány *in vitro* inhibicí diferenciacie lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly a *in vivo* na myším modelu, v dávce 1 mg/kg/den [52].

Z dalších účinků této skupiny alkaloidů lze uvést například antiretrovirové účinky trisphaeridinu, hypotenzní a cytotoxické účinky isminu nebo antineoplastické účinky pankratistatinu [27].

3.2.2.7. Skupina alkaloidů tazettinového typu

Skupina alkaloidů tazettinového typu se vyznačuje přítomností substituovaného 2-benzopyrano-[3.4-c]indolového jádra [32]. Biosyntéza tohoto strukturního typu alkaloidů předpokládá přítomnost haemanthaminu, jako jejich biologického prekursoru, který je hydroxylován (6-C-hydroxylace) na haemanthadin. Následuje otevření kruhu mezi dusíkem v poloze 5 a uhlíkem C6 za vzniku intermediátu aminoaldehydické povahy, který je následně methylován (N-methylace). Aldehydová skupina methylovaného intermediátu reaguje s volným hydroxylem v poloze 11 (hydroxyl původně nesený ethanovým můstkem haemanthadinu), a za vzniku etherové vazby je zformována molekula pretazettinu, který je následně transformován na tazettin [48]. Zástupci tazettinového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na následujícím obrázku. Zástupci tazettinového strukturního typu jsou uvedeny na Obrázek 9.



Obrázek 9 – Tazettinový strukturní typ a jeho zástupci [32][55]

Fytochemický screening druhu *Rhodophiala andicola* (Poepp.) Traub (Amaryllidaceae) prokázal mimo jiných, také přítomnost tazettinu, který byl následně testován vůči *eeAChE* za použití standardu galanthaminu (IC_{50} $0,17 \pm 0,15$ $\mu\text{g/ml}$). Testování probíhalo kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana. Hodnota inhibiční aktivity je vyjádřena jako hodnota IC_{50} [μM] a je uvedena v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám* [53]. Pretazettin, izolovaný z brazilského *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae), byl testován vůči AChE původem z potkaního mozku. Za standard byl zvolen galanthamin (% inhibice > 90). V porovnání se standardem, neprokázal pretazettin téměř žádnou inhibiční aktivitu vůči potkaní AChE [54].

Joanquailin, izolovaný z druhu *Narcissus jonquilla* cv. 'Quail', byl podroben cytotoxickému screeningu na panelu devíti linií nádorových buněk a jeho cytotoxická aktivita byla vyjádřena jako hodnota GI₅₀ (koncentrace potřebná k redukci viability buněk na 50 %) [μM]. V studii prokázal joanquailin (GI₅₀ 28 μM) větší cytotoxicitu vůči linii nádorových buněk U87 než referenční látka (paklitaxel GI₅₀ 96 μM) a také byl prokázán jeho synergický účinek s paklitaxelem vůči linii nádorových buněk H1993, což z něj může v budoucnu učinit potenciální agens pro adjuvantní terapii multidrug rezistentních karcinomů [55]. Synergické účinky, vůči multidrug rezistentnímu karcinomu L5178, byly pozorovány také u pretazettinu a doxorubicinu [27]. Z dalších protinádorových účinků lze uvést například účinek pretazettinu vůči liniím nádorových buněk HeLa, LMTK, MOLT-4 a také vůči Ehrlichovmu tumoru a Lewisovmu plicnímu karcinomu [27].

Mezi další účinky pretazettinu patří například antivirový účinek vůči *Herpes simplex* viru typu 1 (Herpesviridae) a také virům z čeledi Flaviviridae a Bunyaviridae a inhibiční efekt na proteosyntézu zprostředkovaný vazbou na 60S podjednotku ribozomu [27][32].

Tazettin byl testován vůči *Plasmodium falciparum* (Plasmodiidae) – chlorochin senzitivní kmen T9.96 a chlorochin rezistentní kmen K1. Jako standardy pro testování byly zvoleny meflochin a chlorochin. Antimalarická aktivita je vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μM] a je uvedena v **Tabulka 8**. Testovány byly také galanthamin, krinin a lykorin. Krinin a lykorin dosáhly při testování lepší výsledky než galanthamin nebo tazettin, což poukazuje na určitý vztah mezi strukturou těchto alkaloidů a jejich antimalarickou aktivitou. Výsledky naznačují, že alkaloidy, které ve své struktuře obsahují methylenedioxybenzenový cyklus a nesubstituovaný terciární dusík (krinin a lykorin), vykazují signifikantní zvýšení antimalarické aktivity v porovnání s alkaloidy s *N*-methylovaným terciárním dusíkem (galanthamin a tazettin) ve své molekule [56].

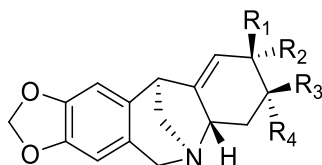
Tabulka 8 – Antimalarická aktivita krininu, lykorinu a tazettinu [56]

ALKALOID	IC ₅₀ [μg/ml]	
	T9.96	K1
GALANTHAMIN	4,800	15,930
KRININ	2,110	1,650
LYKORIN	1,026	0,379
TAZETTIN	5,420	5,080
MEFLOCHIN	-	3,940
CHLOROCHIN	-	6,060

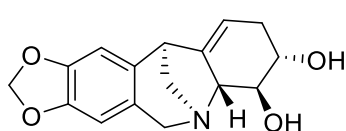
3.2.2.8. Skupina alkaloidů montaninového typu

První alkaloidy montaninového strukturního typu byly izolovány roku 1955 z druhů rodu *Haemanthus* L. (Amaryllidaceae). Jmenovitě je jedná o coccinin, manthidin, manthin a montanin. Alkaloidy mají základ v substituovaném pentacyklickém 5,11-b-metanomorfantridinovém jádru [6][32].

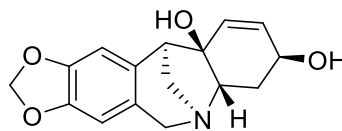
Biosyntéza alkaloidů montaninového typu (hlavně montaninu) nebyla doposud plně pochopena. Jednu z možných biosyntetických cest popisuje studie z roku 2018 u druhu *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (Amaryllidaceae), která předpokládá biosyntézu těchto alkaloidů cestou para-para 'phenol oxidative coupling' kde je normaritin transformován za vzniku 1,3-dioxolanového cyklu na vittatin. Ten je v následujícím kroku hydroxylován (12-C-hydroxylace) na 11-hydroxyvittatin, který pak přeskupuje svoje 5,10-b-ethanofenantridinové jádro na jádro 5,11-b-methanomorfantridinové. Tímto přeskupením jader vzniká pankracin, který je dále methylován (9-O-methylace) na montanin [6][26]. Zástupci montaninového strukturního typu alkaloidů jsou uvedeny na následujícím obrázku – Obrázek 10.



ALKALOID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
PANKRACIN	H	OH	OH	H
BRUNSVIGIN	H	OH	H	OH
MONTANIN	H	OCH ₃	OH	H
COCCININ	OCH ₃	H	OH	H
MANTHIN	H	OCH ₃	OCH ₃	H
MANTHIDIN	H	OCH ₃	H	OCH ₃



nangustin



pankratinin C (squamigin)

Obrázek 10 – Montaninový strukturní typ a jeho zástupci [6]

Pankratinin C, izolovaný z druhu *Narcissus tazetta* subs. *tazetta* L., byl podroben *in vitro* inhibičním testům vůči *eeAChE* a *eqBChE*. Testování proběhlo kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana a jako standard byl zvolen galanthamin (*eeAChE* – IC₅₀ 0,15 μM; *eqBChE* – IC₅₀ 2,47 μM). Pankratinin-C vykazuje slabou aktivitu vůči *eqBChE* a žádnou vůči *eeAChE* [34]. Ve stejné studii jako pretazettin, byl izolovaný také montanin. V porovnání s galanthaminem (% INHIBICE > 90 %), prokázal montanin (% inhibice > 50 %), v 1 mM koncentraci, svou inhibiční aktivitu vůči potkaní AChE [54]. Testování probíhalo kolorimetrickou metodou podle George L. Ellmana a hodnota inhibiční aktivity byla vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μM] a je uvedena v podkapitole *Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasam* [34].

Cytotoxický screening montaninu, izolovaného z *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herb. (Amaryllidaceae) prokázal jeho značnou aktivitu vůči všem testovaným nádorovým liniím – HT29, H460, RXF393, MCF-7 a OVCAR3. Cytotoxická aktivita montaninu je vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μg/ml] a je uvedena v Tabulka 9 [57]. Screening z roku 2018 zas prokázal cytotoxický účinek montaninu a coccininu vůči dalším pěti liniím lidských nádorových buněk – MCF-7, Hs578T, MDA-MB-231, HCT-15, A549 a SK-MEL-28. Cytotoxická aktivita montaninu a coccininu je vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μM] a je uvedena v Tabulka 10 [58]. Ani studie kultivarů rodu *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae) z roku 2019 nezůstala bez pozitivních výsledků. Montanin, izolovaný z těchto kultivarů, prokázal aktivitu vůči dalším osmým liniím nádorových buněčných kultur – Jurkat, MOLT-4, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2. Jako standard pro porovnání cytotoxicity vůči nenádorovým buňkám byla zvolena lidská nenádorová buněčná kultura MRC-5. Cytotoxická aktivita montaninu je vyjádřena jako hodnota IC₅₀ [μM] a je uvedena v Tabulka 11 [59].

Tabulka 9 – Přehled IC₅₀ montaninu vůči lidským nádorovým kulturám; rok 2007 [57]

ALKALOID	IC ₅₀ [μg/ml]				
	HT29	H460	RXF393	MCF7	OVCAR3
MONTANIN	0,71 ± 0,10	0,57 ± 0,57	0,65 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,84 ± 0,11

Tabulka 10 – Přehled IC₅₀ montaninu a coccininu vůči lidským nádorovým kulturám [58]

ALKALOID	IC ₅₀ [μM]					
	MCF7	Hs578T	MDA-MB-231	HCT-15	A549	SK-MEL-29
MONTANIN	4,4 ± 0,4	3,6 ± 1,7	3,4 ± 0,9	6,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	23,2 ± 1,9
COCCININ	7,9 ± 0,9	5,3 ± 0,4	13,8 ± 0,8	16,8 ± 1,8	5,9 ± 0,8	> 50

Tabulka 11 – Přehled IC₅₀ montaninu vůči lidským nádorovým kulturám; rok 2019 [59]

ALKALOID	IC ₅₀ [μM]				
	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1
MONTANIN	1,04 ± 0,14	1,26 ± 0,11	1,09 ± 0,31	1,35 ± 0,47	2,30 ± 0,45
	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
	1,67 ± 0,29	1,99 ± 0,22	1,39 ± 0,21	1,36 ± 0,49	1,79 ± 0,50

V rámci fytochemického screening druhu *Narcissus angustifolius* subs. *transcarpathicus* byly izolované dva alkaloidy montaninového typu. Jedná se o alkaloidy pankracin a nangustin, které byly dále podrobeny inhibičním *in vitro* testům vůči čtyřem parazitům v jejich intracelulárním vývojovém stádiu – *Trypanosoma brucei rhodensiense* (Trypanosomatidae) – kmen STIB 900 a standard melarsoprol; *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) – kmen Tulahuen C4 a standard benznidazol; *Leishmania donovani* (Trypanosomatidae) – kmen MHOM-ET-67/L82 a standard pentostam a *Plasmodium falciparum* (Plasmodiidae) – kmeny K1 a NF54 a standardy chlorochin, artemisinin. Pro potvrzení antiprotozoální selektivity (vyloučení cytotoxicity) alkaloidů byly použity buňky nádorové

linie L6. Na základě výsledků uvedených v **Tabulka 12** byl nangustin označen jako neaktivní a pankracin jako slabě aktivní vůči testovaným kmenům. Účinnost pankracinu způsobena jeho cytotoxicitou byla vyloučena na základě vysoké hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) u buněk nádorové linie L6 ^[60].

Kromě antineoplastické a antiprotozoální účinky vykazuje tyto alkaloidy také účinky antibakteriální. Například montanin a pankracin prokázaly svou antibakteriální účinnost vůči *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae), *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadaceae), *Staphylococcus aureus* (Staphylococcaceae) a montanin navíc také proti *Staphylococcus epidermis* (Staphylococcaceae) ^[6].

Tabulka 12 – Antiprotozoální aktivita pankracinu a nangustinu v porovnání se standardy ^[60]

SUBSTANCE	IC ₅₀ [µg/ml]				MIC [µg/ml]	
	STIB 900	Tulahuen C4	MHOM-ET-67/L82	K1	NF54	L6
MELARSOPROL	0,0014	-	-	-	-	-
BENZNIDAZOL	-	0,40	-	-	-	-
PENTOSTAM	-	-	33	-	-	-
CHLOROCHIN	-	-	-	0,057	0,004	-
ARTEMISININ	-	-	-	0,003	0,004	-
NANGUSTIN	9,60	54,60	> 30	2,14	2,93	> 90
PANKRACIN	0,70	7,10	> 30	0,75	0,70	> 90

3.2.2.9. Přehled inhibičních aktivit amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám

Následující kapitola shrnuje, formou Tabulka 13, výsledky všech *in vitro* inhibičních testů vůči různým typům ChE zmíněných v předchozích kapitolách.

Tabulka 13 – Inhibiční vlastnosti amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám různého původu

TYP	ALKALOID	IC ₅₀ [μM]					Reference
		huACHE	huBChE	eeACHE	eqBChE	n.d. AChE	
BELLADINOVÝ	BELLADIN	-	-	135 ± 4,00	-	-	[30]
	KARLTONIN A	> 100	0,91 ± 0,02	-	-	-	[29]
	KARLTONIN B	> 100	0,031 ± 0,00	-	-	-	[29]
	KARLTONIN C	> 100	1,8 ± 1,10	-	-	-	[29]
LYKORINOVÝ	11-HYDROXYGALANTHIN	-	-	0,67	18,17	-	[34]
	ASSOANIN	-	-	3,87 ± 0,24	-	-	[33]
	ACETYLKARANIN	-	-	11,7 ± 0,70	-	-	[30]
	GALANTHIN	606 ± 60,00	> 500	-	-	-	[36]
	KARANIN	321 ± 42,00	487 ± 55,00	-	-	-	[36]
	LYKORIN	450,00	n.d.	-	-	-	[35]
	NARCISSIDIN	-	-	1,85	-	-	[34]
	O-ACETYLPLUVIIN	> 500	> 500	-	-	-	[36]
	OXOASSOANIN	-	-	47,21 ± 1,13	-	-	[33]
	PSEUDOLYKORIN	-	-	32,51	21,64	-	[34]
	HOMOLYKORINOVÝ	HIPPEASTRIN	> 500	> 500	-	-	-
HOMOLYKORIN		64 ± 4,00	151 ± 20,00	3,396	2,67	-	[36] [44]
LYKORENIN		> 500	> 500	-	-	-	[36]
MASONIN		305 ± 34,00	229 ± 24,00	-	-	-	[36]
NORMASONIN		> 500	474 ± 13,00	-	-	-	[36]
ODULIN		> 500	> 500	-	-	-	[36]
O-ETHYLLYKORENIN		> 500	> 500	-	-	-	[36]
O-METHYLLYKORENIN		> 500	> 500	-	-	-	[36]
TETRAHYDROMASONIN	> 500	> 500	-	-	-	[36]	
GALANTHAMINOVÝ	11-HYDROXYGALANTHAMIN	-	-	1,61 ± 0,21	-	-	[33]
	EPINORGALANTHAMIN	-	-	9,60 ± 0,65	-	-	[33]
	GALANTHAMIN	1,70 ± 0,10	42,3 ± 1,30	0,15	2,47	-	[34][36]
	LYKORAMIN	456 ± 57,00	> 500	-	-	-	[36]
	NARWEDIN	281 ± 34,00	911 ± 69,00	-	-	-	[36]
SANGUININ	-	-	0,10 ± 0,01	-	1,83 ± 0,01	[33][45]	

HAEMANTHAMI- NOVÝ A KRINOVÝ	EPIMARITIDIN	> 500	> 500	-	-	-	[36]
	HAEMANTHAMIN	> 500	> 500	-	-	-	[36]
	SECO- ISOPOWELLAMINON	294 ± 33,00	> 500	-	-	-	[36]
	FLEXININ	-	-	-	-	164,60 ± 1,12	[45]
	KRININ	> 500	> 500	-	-	161,30 ± 0,80	[36][45]
OSTATNÍ TYPY STRUKTUR	NARCIPRIMIN	-	-	78,9 ± 1,96	-	-	[50]
	TRISPHAERIDIN	> 100	> 100	-	-	-	[29]
	TAZETTIN	-	-	441,04 ± 1,67 [µg/ml]	-	-	[53]
	PANKRATININ-C	-	-	-	32,04	-	[34]

3.2.3. Alkaloidy druhu *Narcissus pseudonarcissus* L.

Následující kapitola uvádí, formou [Tabulka 14](#), zastoupení jednotlivých alkaloidů v kultivarech druhu *Narcissus pseudonarcissus* L.

Na základě údajů uvedených v [Tabulka 14](#), lze za majoritně vyskytující se alkaloidy v druzích *Narcissus pseudonarcissus* L., označit alkaloidy lykorinového strukturního typu – galanthin, lykorin a pluviin. Dále také lze uvést také hlavní zástupce dalších tří strukturních typu alkaloidů, a to homolykorin, galanthamin a haemanthamin.

Tabulka 14 – Přehled alkaloidů přítomných v kultivarech druhu *Narcissus pseudonarcissus* L.

ALKALOID	KULTIVAR																					Reference				
	Carlton	Covent garden	Early glory	Flower carpet	Golden harvest	Grand maître	Dutch master	Imperator	King alfred	Magnet	Magnificence	Mount hood	Mrs. Ernst H. Krelage	Music hall	Oliver Cromwell	President lebrun	Queen of bicolors	Rembrant	Rockery beauty	Romaine	Spring glory		Unsurpassable	Victoria	Vrestler	
KARLTONIN A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29]
KARLTONIN B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29]
KARLTONIN C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29]
ASSOANIN	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[32]
GALANTHIN	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	[29][32][36]
LYKORIN	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	[32]
NARCISSIDIN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	[32]
PLUVIIN	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	[32]
HIPPEASTRIN	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]
HOMOLYKORIN	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29][32][36]
LYKORENIN	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	[29][32][36]
MASONIN	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29][36]
NORMASONIN	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[32]
ODULIN	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29][36]
TETRAHYDROMASONIN	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]
EPINORLYKORAMIN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[32]
GALANTHAMIN	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	[29][32][36]
LYKORAMIN	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]
NORGALANTHAMIN	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	[32]
NORLYKORAMIN	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	[32]
NARWEDIN	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]
EPIMARITIDIN	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]

HAEMANTHAMIN	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	[29][32][36]
NARCIDIN	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[32]
SECO-ISOPOWELLAMINON	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]
VITTATIN	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29][32]
KRININ	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[36]
NARCIKLASIN	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	[32]
TRISPHAERIDIN	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[29]
TAZETTIN	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[32][36]

- + přítomnost daného alkaloidu v kultivaru druhu *Narcissus pseudonarcissus* L.
- nepřítomnost daného alkaloidu v kultivaru druhu *Narcissus pseudonarcissus* L.

4. Alzheimerova nemoc

AD je ireverzibilní neurodegenerativní onemocnění, které bylo objeveno v roce 1906 německým psychiatrem Aloisem Alzheimerem při autopsii jeho 51-leté pacientky, u které byly před její smrtí pozorovány symptomy jako například ztráta paměti, poruchy řeči, dezorientace a halucinace. Při autopsii pacientky objevil Alzheimer v její mozkové kůře neobvyklé útvary (plaky a klubka) na základě čeho usoudil, že se nejedná o klasický typ demence. Jeho objev byl následován několika dalšími studiemi, které u pacientů s demencí prokázaly přítomnost plaků tvořených z defektního proteinu A β ^[61].

Patogeneze u AD je způsobena skupinou onemocnění nazývaných proteinopatie, které jsou charakteristické depozicí různých degradačních forem některých proteinů nazývaných amyloidy. Terciární struktura amyloidů je ve formě β skládaného listu, což způsobuje vznik fyziologicky neaktivních forem proteinů, které jsou odolné vůči proteolýze, deponují se v různých orgánech a způsobují různá onemocnění ^{[61][62]}. Podle druhu defektního proteinu můžeme proteinopatie rozdělit na několik druhů, a to na tautopatie (např. progresivní supranukleární paralýza), TDP-43 proteinopatie (např. frontotemporální demence), synukleinopatie (např. Parkinsonova nemoc), prionové proteinopatie (Creutzfeldt-Jakobova nemoc) a v neposlední řadě také skupina charakteristická přítomností A β , kam řadíme AD ^[63].

V časných stádiích se AD začíná projevovat jako amnestický syndrom (porucha krátkodobé paměti; přítomna je dezorientace a konfabulace) s poruchou dlouhodobé epizodické paměti, který má tendenci progredovat. Charakteristické pro toto časné stádium je patologické poškození transtentoriální oblasti mozku, parahipokampálního závitu a hipokampu. V pozdějších stádiích patologie onemocnění progreduje ve směru poškození temporálních, následně parietálních a nakonec frontálních mozkových struktur. Tyto pozdní změny se u nemocných projevují jako poruchy řeči, zrakově-konstruktivní a exekutivní dysfunkce ^[63].

4.1. Neuropatologie Alzheimerovy nemoci

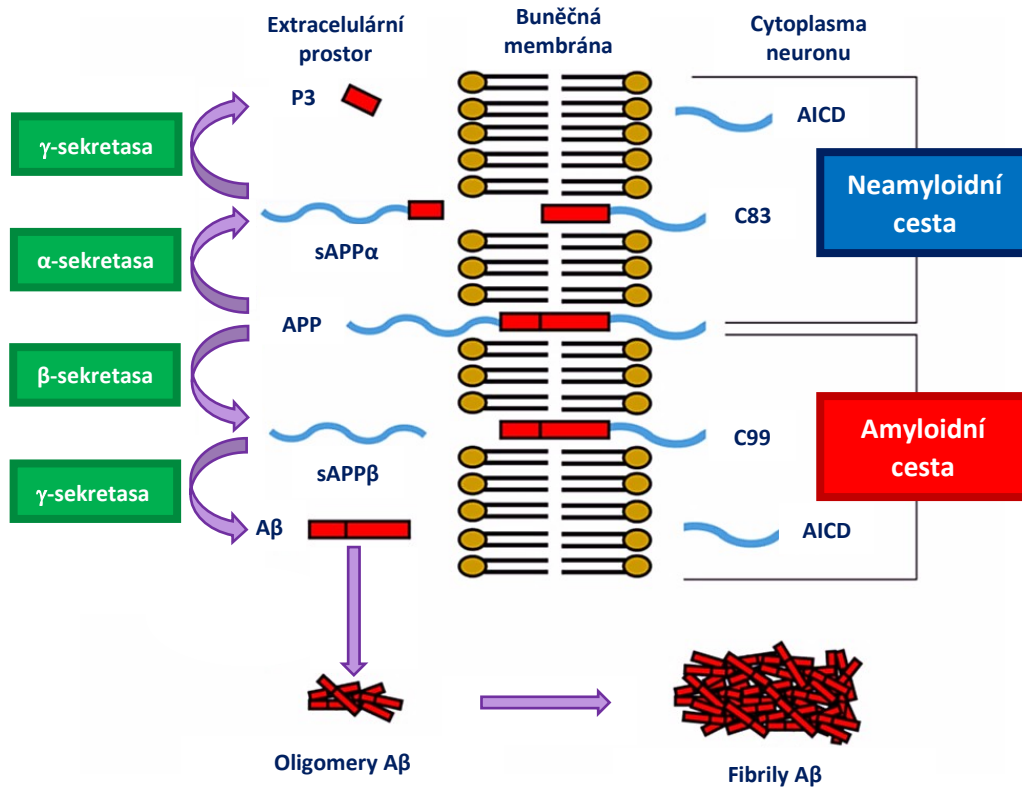
4.1.1. Senilní plaky amyloidu β

Amyloidový prekurzorový protein (APP) je transmembránový protein pozůstávající ze 770 aminokyselinových jednotek. Můžeme ho rozdělit na tři části, a to na N-terminální extracelulární část, část transmembránovou a C-terminální cytosolickou část. I přesto, že jeho fyziologická funkce nebyla doposud plně objasněna, je známo, že je důležitý pro buněčný růst, motilitu buněk a elongaci axonu nervových buněk. APP může být štěpen dvěma proteolytickými cestami, a to neamyloidní (fyziologická, konstitutivní) a amyloidní (patologická) cesta ^{[61][64]}.

Štěpení APP fyziologickou, neamyloidní proteolytickou cestou, probíhá pomocí neuronálních transmembránových enzymů s α - a γ -sekretasovou aktivitou ^{[64][65]}. α -Sekretasovou aktivitu v lidských neuronech vykazují hlavně tři zástupci z rodiny dezintegrinů a metaloproteas – ADAM9, ADAM10, ADAM17 ^{[65][66]}. Tyto metaloproteasy štěpí APP na dvě peptidické domény. Jedná se o extracelulární N-terminální doménu – sAPP α , která je uvolněná do extracelulární tekutiny a intracelulární C-terminální doménu – C83, která je ukotvena v plazmatické membráně ^{[61][64]}. Doména sAPP α hraje významnou roli při neurochemických dějích v mozku. Například se podílí na udržení adekvátní neuronální plasticity, ochraňuje neurony před nadměrnou excitotoxicitou a reguluje proliferaci neuronálních kmenových buněk ^[65]. Dále se podílí na fyziologickém přenosu nervového signálu, procesu učení, tvorby paměti a emočním chování jedince ^[61]. Doména C83 je dále štěpená pomocí transmembránového komplexu čtyřech enzymů, (PSEN1/PSEN2, NCSTN, APH-1 a PEN-2) vykazujících γ -sekretasovou aktivitu, a to na hydrofobní fragment – P3, který je uvolněný do extracelulární tekutiny a fragment – AICD, který je uvolněn do cytosolu ^{[64][65]}. Po uvolnění z plazmatické membrány je fragment AICD translokován do buněčného jádra, kde se podílí na buněčných dějích jako například regulace genové exprese nebo jaderné signalizace. Ačkoliv je známo, že se podílí na přenosu nervového signálu, tak není funkce fragmentu P3 prozatím plně pochopena ^[61]. Fyziologická cesta proteolytického štěpení APP je uvedena na [Obrázek 11](#).

Při patologické amyloidní cestě proteolýzy, je APP štěpen pomocí enzymu BACE1. Jedná se o transmembránovou aspartátovou proteasu s β -sekretasovou aktivitou ^[61]. Podobně jako α -sekretasy, štěpí tato proteasa APP na dvě domény – extracelulární N-terminální doména sAPP β a intracelulární C-terminální doména C99, která je stejně jako doména C83, ukotvená v plazmatické membráně ^[64]. I přes malý rozdíl v struktuře mezi sAPP α a sAPP β , je jejich role při neurochemických procesech v mozku značně odlišná. Zatím co sAPP α pozitivně ovlivňuje tyto děje, tak sAPP β se podílí na redukci axonů nervových buněk a prostřednictvím vazby na DR6 ('Death Receptor 6') způsobuje jejich buněčnou smrt ^[65]. Doména C99 je následně štěpená γ -sekretasovým komplexem na dva fragmenty, a to na již zmíněný cytosolický fragment AICD a extracelulární fragment A β ^[64]. Podle místa na aminokyselinovém řetězci, kde se doména C99 rozštěpí, dělíme fragment A β na dva typy (podle délky aminokyselinového řetězce), a to na A β 40 a A β 42 ^{[61][65]}. Oba tyto fragmenty agregují na oligomery a následně polymerují do větších fibrilárních, nerozpustných, extracelulárních celků – plaky A β (amyloidní/senilní plaky – [Příloha 15](#) a [Příloha 16](#)), které blokují iontové kanály, blokují uptake glutamátu do mikroglie, narušují vápníkovou homeostázu a snižují energetický metabolismus ^{[61][67]}. Nastává také produkce cytokinů v důsledku, čehož dochází k aktivaci mikroglie a astrocytů, a rozvíjí se sterilní záněť – [Příloha 19](#). Následně se rozvíjí mitochondriální oxidační stres, což vede k produkci reaktivních forem kyslíku, které poškozují neurony ^[68]. Výsledkem všech těchto negativních

jevů je rozsáhlá synaptická, resp. neuronální dysfunkce, která je zakončena buněčnou smrtí neuronů formou apoptózy. Oligomery A β 40 a A β 42 dále způsobují aktivaci buněčných kinas a fosfatas, což vede k zvýšené tvorbě neurofibrilárních klubek (NFTs) ^{[61][67][68]}. Patologická cesta proteolytického štěpení APP je uvedena na následujícím obrázku – Obrázek 11.



Obrázek 11 – Neamyloidní a amyloidní cesta proteolýzy amyloidového prekurzorového proteinu⁹ ^[64]

4.1.2. Neurofibrilární klubka hyperfosforylovaného τ proteinu

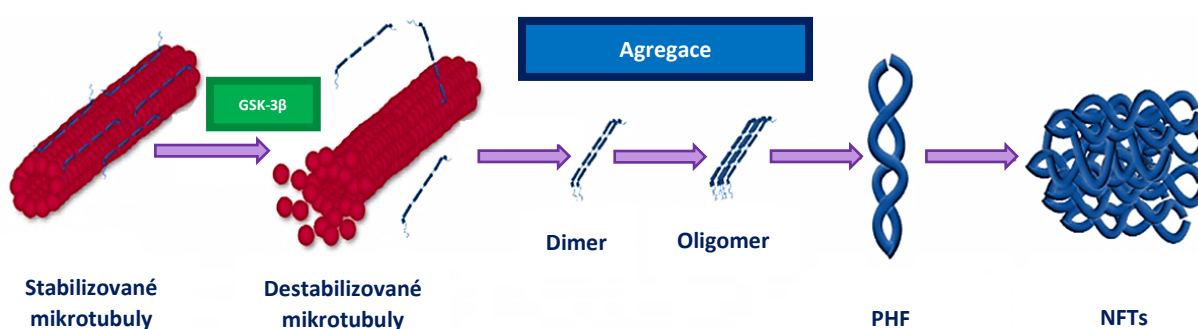
Tau (s tubulinem asociovaná jednotka) protein – τ protein, je cytosolický protein, který patří do skupiny proteinů označovaných jako MTP (s mikrotubuly asociované proteiny). Je kódovaný genem MAPT, přítomným na sedmáctém lidském chromozomu ^{[65][69]}. V lidském organismu se vyskytuje v šesti izoformách, z kterých každá má různou délku aminokyselinového řetězce (352 – 411 jednotek) a různý počet serin-threoninových akceptorových zbytků vázajících fosfátové skupiny. Můžeme ho rozdělit na čtyři části, a to na N-terminální doménu, PRP (‘proline-rich region’), MTBR (‘microtubule binding region’) a C-terminální doménu ^[69]. Za fyziologických podmínek se τ protein podílí na stabilizaci cytoskeletálních mikrotubulů¹⁰ neuronů (i ostatních buněk), podporuje růst jejich axonů a prostřednictvím, již zmíněné, stabilizace mikrotubulů umožňuje, resp. usnadňuje v rámci buňky anterográdní a retrográdní transport buněčných organel (zejména mitochondrií), který je

⁹ Původní obrázek byl přeložen a upraven autorem.

¹⁰ Mimo stabilizaci samotného mikrotubulu, je τ protein rovněž schopen spájet i sousedící mikrotubuly mezi sebou a vytvářet mezi nimi tzv. „můstky“ ^[61].

zprostředkovaný pomocí molekulárních motorů (kinesiny a dyneiny) ^{[61][65]}. Předpokládá se, že přítomnost mitochondrií, v různých částech neuronů, úzce souvisí s požadavkem na energetické nároky těchto lokalit. Navíc se předpokládá, že jsou mitochondrie schopny puřovat vápenné ionty, což potenciálně může ovlivňovat excitotoxicitu vápníku, vyvolanou excitačním *N*-methyl-D-aspartatovým (NMDA) receptorem ^[65].

Stabilizace mikrotubulů a tím pádem i vazebnost τ proteinu na ně, je podmíněná stupněm jeho fosforylace. Extenzivně fosforylovaný τ protein není schopen dostatečně pevné vazby na α - a β -tubulinové podjednotky mikrotubulů v důsledku, čeho je narušená jejich dynamická nestabilita ve směru dezorganizace jejich struktury ^{[61][69]}. Tato extenzivní fosforylace (hyperfosforylace) τ proteinu je zapříčiněna enzymy s kinasovou aktivitou, které fosforylují jeho serin-threoninové akceptorové zbytky. Majoritně se jedná o glykogensyntasu kinasu 3 β (GSK-3 β) a cyklin-dependentní kinasu 5 (CDK5), které jsou nadměrně aktivovány prostřednictvím oligomerů A β 40 a A β 42. Z dalších kinas, pravděpodobně podílejících se na této fosforylaci, lze uvést například protein kinasu A (PKA), protein kinasu C (PKC), kaspasu 3 (CASP3), kaspasu 9 (CASP9) nebo extracelulárním signálem regulovanou kinasu 2 (ERK2) ^{[61][69]}. Volný, hyperfosforylovaný τ protein následně agreguje do dimerů–oligomerů, které pak vytvářejí helikální filamentum. Tyto filamenta společně interagují za formace stočené dvoušroubovicové struktury – spárované helikální filamenta (PHF) – Příloha 18; a ty následně agregují za vzniku vysoce nerozpustných fibrilárních struktur – neurofibrilární klubka (NFTs) – Obrázek 12 a Příloha 17 ^{[65][70]}. NFTs se deponují v cytoplasmě, což vede ke ztrátě komunikace mezi neurony a následně k jejich buněčné smrti formou apoptózy ^[70].



Obrázek 12 – Proces tvorby neurofibrilárních klubek hyperfosforylovaného τ proteinu^{11 [70]}

4.1.3. Cholinergní a glutamátergní hypotéza

Koncem 70. let 20. století byla vyslovena hypotéza, která označila snížení cholinergní neurotransmise v mozku za hlavní příčinu vzniku AD. Podle hypotézy je nedostatek ACh u pacientů s AD způsoben sníženou funkcí enzymu cholin acetyltrasferasa v cerebrálním kortexu a hipokampu, která

¹¹ Původní obrázek byl přeložen a upraven autorem.

je zodpovědná za syntézu ACh z jeho biologických prekurzorů – cholin a acetyl-CoA. Na snížení množství ACh se podílí také enzym BChE, kterého hladiny jsou u AD zvýšené a také je snížený uptake cholinu do presynaptického neuronu. Na podkladu této hypotézy a vzhledem k jasně prokázané negativní korelaci mezi vznikem kognitivní poruchy a množstvím ACh byly postupem času do terapie AD zařazeny čtyři látky jak přírodního, tak syntetického původu – takrin¹², galanthamin, rivastigmin a donepezil. Všechny tyto léčiva patří do skupiny centrálně působících nepřímých cholinomimetik a jejich mechanismus účinků tkví v inhibici enzymu – AChE, čehož výsledkem je snížená degradace ACh a tím pádem zvýšená koncentrace v synaptické štěrbině ^{[71][72][73]}.

Na rozdíl od cholinergního (poškozen již v časných stádiích) nastává postižení excitačního glutamatergního systému až v pozdních, těžších stádiích AD. Glutamatergní hypotéza má za to, že při AD nastává v mozku zvýšení množství glutamátu a také je snížený jeho uptake zpět do neuronů. Vzhledem k zvýšené přítomnosti glutamátu v synaptické štěrbině nastává zvýšení aktivity excitačního NMDA receptoru, což je ionotropní receptor spřažený s iontovým kanálem, který se po aktivaci receptoru otevírá, a má za následek influx sodných a vápenných iontů do cytosolu a eflux draselných do extracelulárního prostoru. Zvýšená aktivita NMDA receptoru má za následek narušení neuronální plasticity a později také smrt neuronů v důsledku nadměrné excitotoxicity, která je zapříčiněná zvýšeným množstvím vápníků v cytosolu. Na základě těchto znalostí byl postupem času do terapie AD zařazen antagonist NMDA receptoru – memantin, který byl prvně objeven v roce 1963 při přípravě derivátů *N*-arylsulfonyl-*N'*-adamantylurey, jako nových léčiv s potenciálním hypoglykemickým účinkem ^{[67][71][74]}.

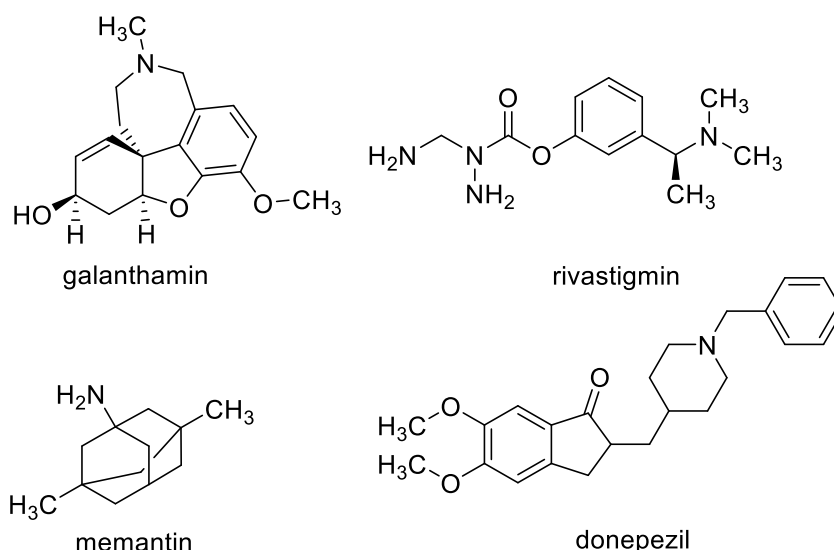
¹² První inhibitor cholinesteras používaný v praxi koncem 90. let 20. století. Pro jeho hepatotoxicitu se dnes nepoužívá ^[73].

4.2. Terapie Alzheimerovy nemoci

Podle EBM (medicína založená na důkazech), můžeme terapii AD rozdělit na dva typy, a to na terapii kognitivního deficitu a terapii behaviorálních a psychologických symptomů demence (BPSD). Cílem kognitivní farmakoterapie je zabránit progresi nemoci, oddálit nástup těžších stádií demence a zachovat pacientovu soběstačnost, aby nemusel být umístěn do specializovaných zařízení zabezpečujících starostlivost o pacienty trpících demencí. Kognitivní farmakoterapie, jak již bylo zmíněno, je založena na principech EBM a zahrnuje dvě hlavní skupiny léčiv, a to inhibitory ChE (galanthamin, rivastigmin a donepezil) a inhibitory NMDA receptoru (memantin) [71].

Tabulka 15 – Přehled indikací, nežádoucích účinků a kontraindikací EBM léčiv užívaných k terapii Alzheimerovy nemoci [64][71]

LÉČIVO	MECHANISMUS ÚČINKU	INDIKACE	NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	KONTRAINDIKACE
GALANTHAMIN	Inhibitor AChE Modulátor nAChRs	Lehká a středně těžká forma AD	Nauzea Dyspepsie	Aktivní vředová choroba gastroduodena
DONEPEZIL	Inhibitor AChE	Lehká a středně těžká forma AD a idiopatické Parkinsonové nemoci	Nechutenství a ztráta hmotnosti Průjem Anorexie Bradykardie	Poruchy převodního systému srdečního
RIVASTIGMIN	Inhibitor AChE Inhibitor BChE	Středně těžká a těžká forma AD	Excitace Přechodná psychotická symptomatika	Bludy Halucinace Iluze



Obrázek 13 – Inhibitory cholinesteras a N-methyl-D-aspartátového receptoru [32][73]

Obě skupiny léčiv je možno kombinovat s dalšími léčivými přípravky a potravními doplňky ze skupiny vitamínů (D- α -tokoferol, retinol, kyselina listová, vitamín B12), minerálů (zinek), nootropik

(piracetam, pyritinol), fytofarmak (kurkuminoidy, extrakt EGb 761, česnekový extrakt, rybí olej a jiné), nesteroidních antiflogistik (kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, R-flurbiprofen, koxiby), inhibitorů monoaminoxidasy-B (selegilin, rasagilin) a mnohé jiné. Tyto skupiny léčiv nemají anebo mají jenom minimální terapeutický efekt na progres nemoci a jejich terapeutické použití není v souladu s EBM [71].

Jak již z názvu plyne, je terapie BPSD zaměřená na eliminaci stavů ovlivňujících chování a psychiku pacientů. Může se jednat o rozličné poruchy psychotického charakteru, kterých příznaky mohou být například rozličné iluze a halucinace, misidentifikace, abulie, agresivita, apatie, agitovanost nebo konfabulace. Rovněž může být přítomná deprese nebo poruchy spánkového rytmu, přičemž všechny zmíněné poruchy se mohou vzájemně mezi sebou překrývat. Při akutních záchvatech agitovanosti nebo agrese, se používají incisivní butyrofenonové neuroleptika první generace (haloperidol, melperon) nebo parenterálně podávaný diazepam. Pro dlouhodobější léčbu těchto stavů jsou vhodná atypická benzamidové neuroleptika druhé generace (tiaprid). Pro krátkodobou léčbu úzkostných stavů lze využít benzodiazepinová anxiolytika (alprazolam, lorazepam). Při psychotických stavech s přítomnými iluzemi, halucinacemi nebo konfabulacemi se používají atypická tricyklická neuroleptika druhé generace (olanzapin, kvetiapin), nebo atypická neuroleptika druhé generace, strukturně podobná butyrofenonovým neuroleptikům (risperidon). Při depresivních poruchách jsou thymoleptiky první volby selektivní inhibitory serotoninového reuptaku (citalopram, escitalopram, sertralin). Antagonisti a reuptake inhibitory serotoninu (trazodon) nebo noradrenergní a specifické serotoninergní thymoleptika (mirtazapin), se podávají při depresích s insomnií. Pro krátkodobou léčbu isomnie lze rovněž využít také nebenzodiazepinová hypnotika (zaleplon, zolpidem, zopiklon) [68][71][73].

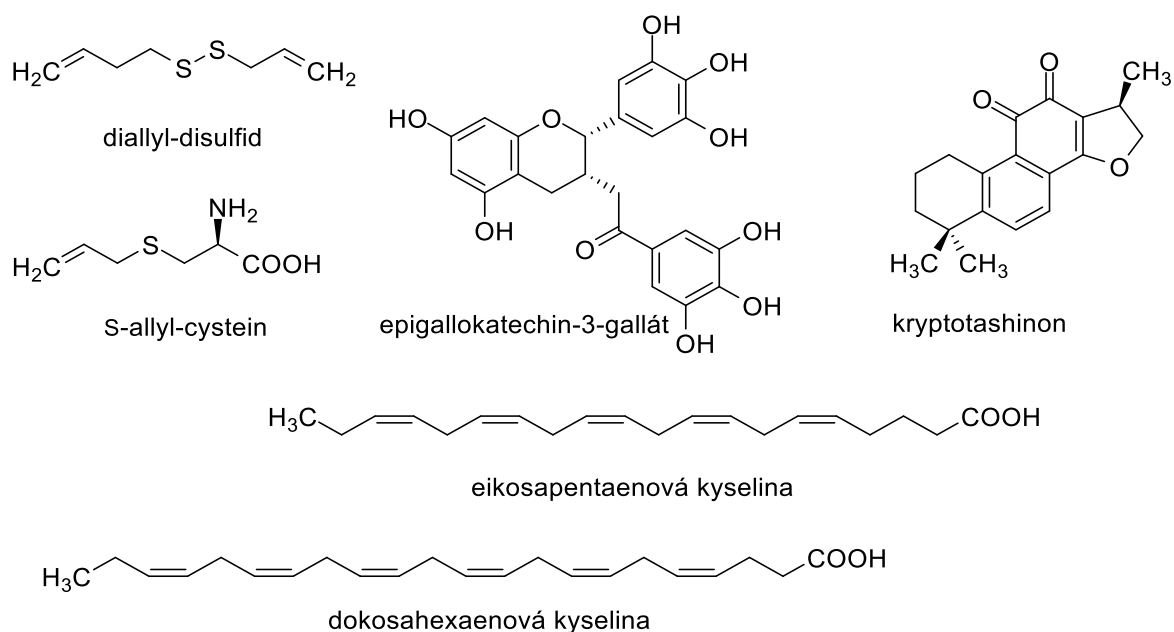
Mimo výše uvedené poznáme také terapii nefarmakologickou, které cílem je podpořit pacienta v úvodní fázi onemocnění, poskytnou mu dostatečné informace o jeho onemocnění, zachovat a zlepšit kognitivní funkce – například pomocí kognitivní rehabilitace nebo reminiscenční terapie, dále zachovat a zlepšit soběstačnost nemocných v každodenním životě, zmírnit nebo úplně odstranit BPSD (metoda Marthe Meo nebo SimPres) a v terminální fázi demence zlepšit jejich kvalitu života [75].

4.2.1. Potenciální fytofarmakologické možnosti terapie Alzheimerovy nemoci

4.2.1.1. Enhancery α -sekretasy

Mimo své protektivní účinky na kardiovaskulární systém vykazuje *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), také pozitivní účinky při terapii AD. *In vitro* studie, na myším modelu se Švédskou mutací Tg2576, prokázala u česnekového extraktu (přípraven macerací čerstvého česneku, v 20% ethanolu, při pokojové teplotě po dobu 20 měsíců) zvýšenou přítomnost sAPP α domény o 58,9 % a sníženou přítomnost fragmentu A β . Za hlavní složky extraktu, vykazující tyto účinky, byly označeny dvě látky, a to diallyl-disulfid a s-allyl-cystein [76]. Další přírodní látkou zvyšující α -sekretasovou aktivitu

je polyfenol epigallokatechin-3-gallát, který je hlavní obsahovou látkou zeleného čaje. Jeho účinky – zvýšení produkce domény sAPP α a snížení množství fragmentu A β , byly potvrzeny *in vitro* studií na nervových buňkách myšního modelu Tg2576. Z dalších přírodních enhancerů α -sekretasy lze uvést například kryptotashinon, izolovaný z kořenů druhu *Salvia multiorrhiza* Crevost & Pételot (Lamiaceae) jehož účinek byl potvrzen *in vitro* na chimérickém myším modelu s transfekovaným genem pro mutaci APP a PSEN1; extrakt EGb 761 z *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae), který zvyšuje produkci domény sAPP α prostřednictvím aktivace neamyloidní proteolytické cesty nebo ω -3 nenasycené mastné kyseliny (eikosapentaenová a dokosaheptaenová kyselina), které jsou obsaženy v rybím oleji [64]. Jako registrovaný léčivý přípravek je na českém trhu dostupný pouze extrakt EGb 761 [77]. Jinak všechny, výše zmíněné, látky resp. drogy jsou dostupné ve formě rozličných potravních doplňků – například sušené kořeny, sušené mleté listy, tinktury a jiné [78]. Přírodní inhibitory α -sekretasy jsou uvedeny na následujícím obrázku – Obrázek 14.

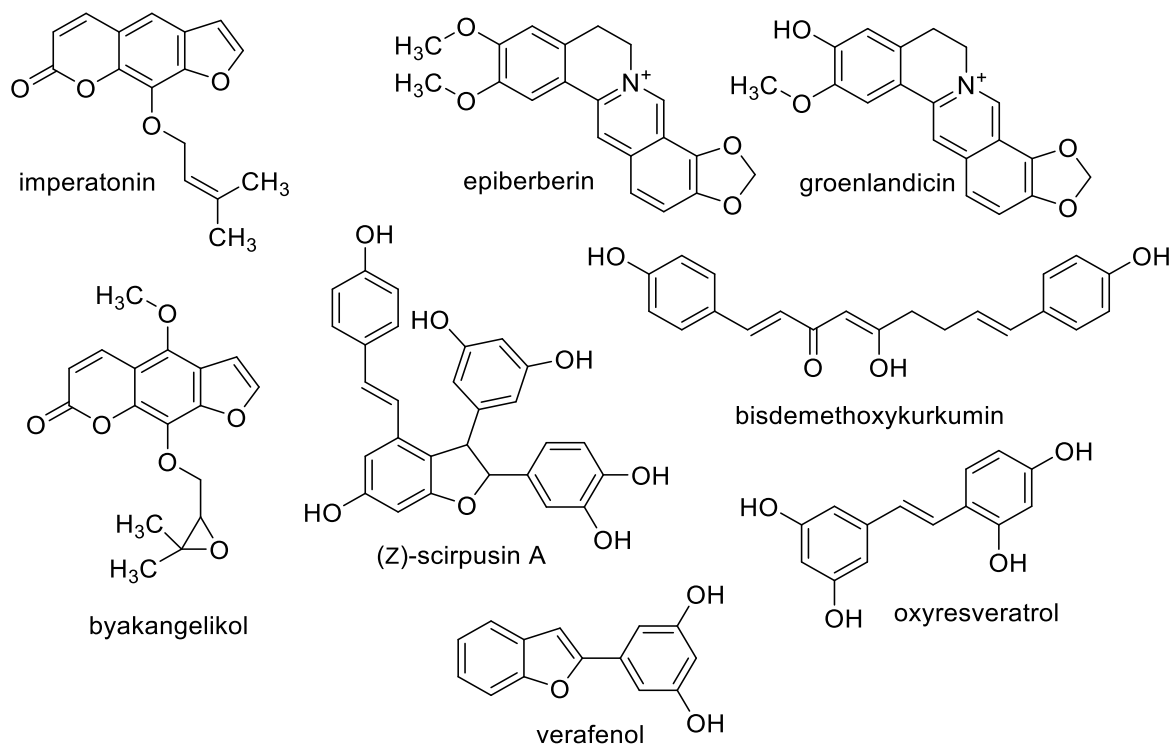


Obrázek 14 – Přírodní enhancery α -sekretasy [64] [76]

4.2.1.2. Inhibitory β -sekretasy

Z přírodních látek vykazujících inhibiční vlastnosti vůči β -sekretasové aktivitě enzymu BACE1 lze uvést například furanokumariny, izolované z kořenů druhu *Angelica dahurica* (Hoffm.) Benth. & Hook.f. ex. Franch. & Sav. (Apiaceae). Jmenovitě se jedná o furanokumariny imperatonin (IC_{50} $91,8 \pm 7,5 \mu M$) a byakangelikol (IC_{50} $104,9 \pm 2,4 \mu M$) [79]. Z dalších přírodních sloučenin lze uvést například protoberberinové alkaloidy epiberberin (IC_{50} $8,55 \pm 1,29 \mu M$) a groenlandicin (IC_{50} $19,68 \pm 1,42 \mu M$), izolované z oddenků *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae); stilbenoidy (z)-scirpusin A (IC_{50} $10,0 \mu M$), verafenol (IC_{50} $4,2 \mu M$) a oxyresveratrol (IC_{50} $7,6 \mu M$), izolované z oddenků druhu *Smilax china* L. (Smilacaceae) nebo kurkuminoid bisdemethoxykurkumin

(IC₅₀ 17,0 μM) pocházející z oddenků druhu *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) ^{[80][81][82]}. Přírodní inhibitory β-sekretasy jsou uvedeny na následujícím obrázku – Obrázek 15.

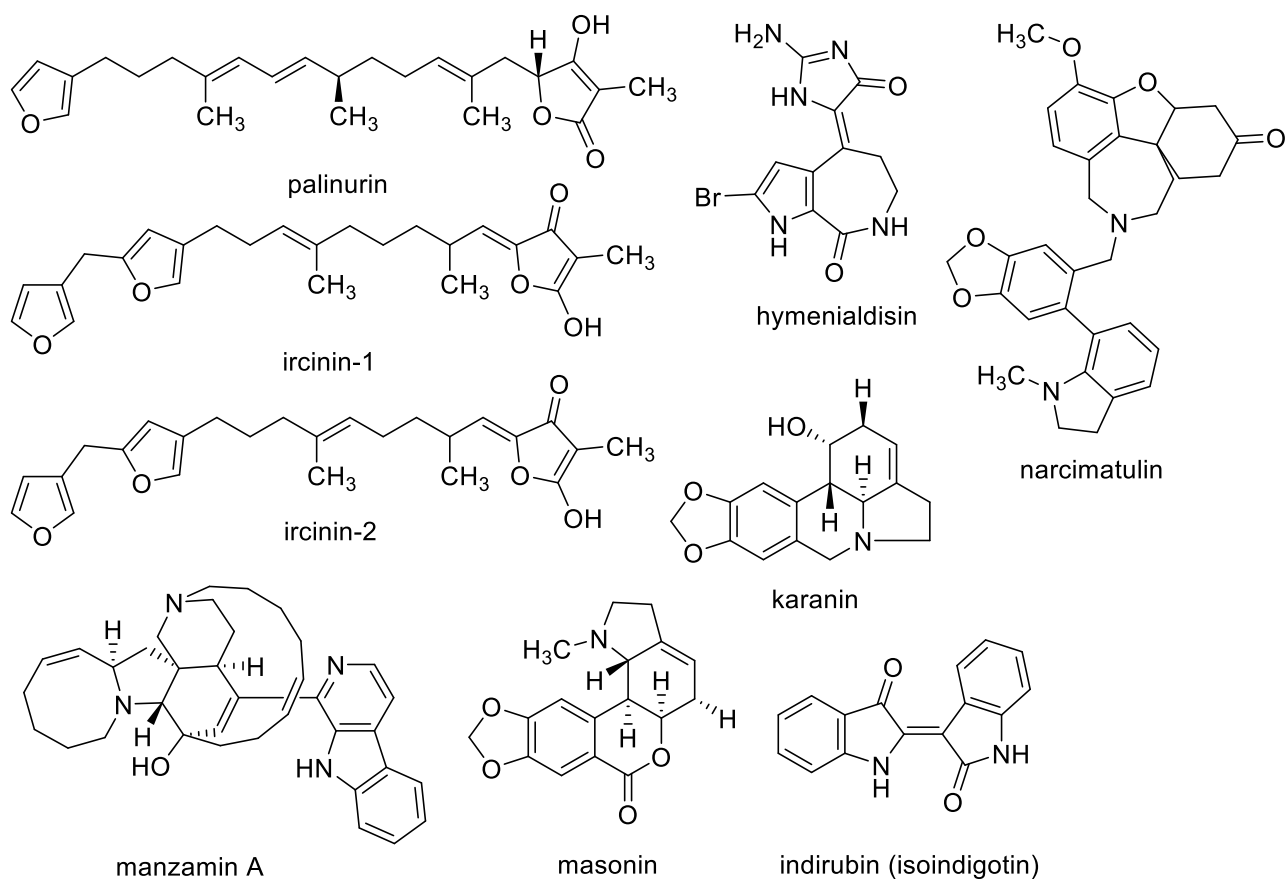


Obrázek 15 – Přírodní inhibitory BACE1 ^{[79][80][81][82]}

4.2.1.3. Inhibitory glykogensyntasy kinasy 3β a cyklin-dependentní kinasy 5

Inhibiční aktivitu vůči GSK-3β prokázaly furanosekviterpeny palinurin (IC₅₀ 1,9 μM), ircinin-1 (IC₅₀ 0,8 μM) a ircinin-2 (IC₅₀ 2,3 μM), izolovány ze středomořských mořských hub rodu *Ircinia* spp. Nardo (Irciniidae) ^[83]. Rovněž bromopyrrolový alkaloid hymenialdisin (IC₅₀ 0,010 μM), vyskytující se v mořských houbách patřících do čeledi Agelasidae, Axinellidae a Halichondriidae, prokázal svou aktivitu vůči GSK-3β, a navíc také aktivitu vůči cyklin-dependentní kinase 5 (CDK5 – IC₅₀ 0,028 μM) ^[84]. Z dalších alkaloidů, s inhibičním účinkem vůči GSK-3β, můžeme uvést například β-karbolinový alkaloid manzamin A (IC₅₀ 10,2 μM), vyskytující se v některých mořských houbách rodu *Acanthostrongylophora* Hooper (Petrosiidae) nebo *Haliclona* Grant (Chalinidae) ^[85]. Také indirubin, bis-indolové červené barvivo vyskytující se například v druhu *Polygonum tinctorium* Aiton (Polygonaceae), prokázal svou aktivitu vůči GSK-3β (IC₅₀ 0,6 μM) a CDK-5 (IC₅₀ 5,5 μM) ^{[86][87]}. Z amarylkovitých alkaloidů se zajímavou aktivitou vůči GSK-3β vyznačují alkaloidy masonin (IC₅₀ 27,9 ± 0,8 μM), karanin (IC₅₀ 30,8 ± 0,3 μM) a narcimatulin (IC₅₀ 20,7 ± 2,4 μM) ^[36].

Indirubin je v dnešní době dostupný jako součást tradiční čínské směsi jedenácti bylin – Danggui Longhui Wan, která obsahuje 5 % složky Qing Dai (*Indigo naturalis*) s minoritním zastoupením indirubinu ^{[86][88]}. Přírodní inhibitory GSK-3β jsou uvedeny na následujícím obrázku – Obrázek 16.



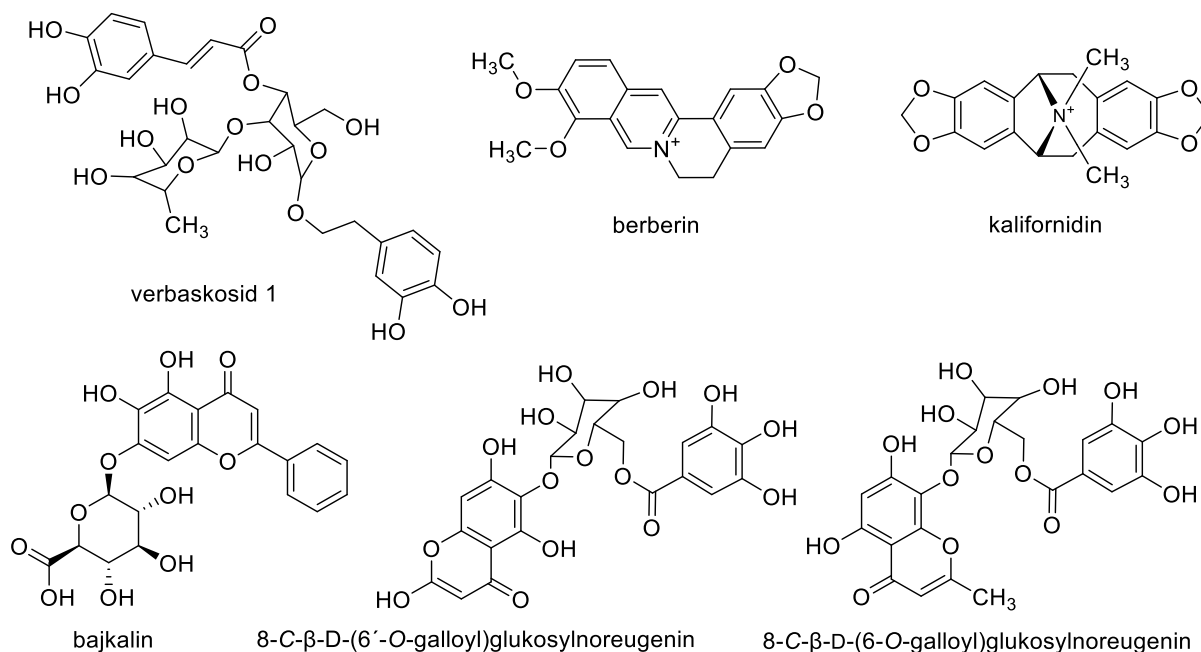
Obrázek 16 – Přírodní inhibitory glykogensyntasy kinasy 3β [36][83][84][85][86]

4.2.1.4. Inhibitory prolyl oligopeptidasy

Prolyl oligopeptidasu (POP) řadíme mezi cytosolické serinové proteasy, které úloha spočívá v hydrolýze peptidů obsahujících prolin. Je prokázáno, že její aktivita je významná pro některé fyziologické děje – učení, tvorba paměti, dělení a diferenciacie buněk. Substrátem této proteasy jsou neurotropní peptidy a hormony jako například substance P, TRH ('Thyrotropin-Releasing Hormone') nebo β-endorfin. Tyto neurosubstance mají důležitou roli v transdukci buněčných signálů, prostřednictvím regulace množství IP₃ (druhý posel), který po navázání na intracelulární membránový receptor endoplasmatického retikula otevírá iontový kanál pro vápenaté ionty [89].

Z přírodních látek vykazujících zajímavou inhibiční aktivitu vůči POP můžeme uvést například C-glukosidy chromen-4-onu, izolované ze sušených pupenů *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (Myrtaceae). Jedná se o glukosidy 8-C-β-D-(6-O-galloyl)glukosylnoreugenin (IC₅₀ 1,48 ± 0,02 μM) a 6-C-β-D-(6'-O-galloyl)glukosylnoreugenin (IC₅₀ 1,74 ± 0,03 μM) [90]. Dále lze uvést například fenylpropanový glykosid, izolovaný z druhu *Buddleja brasiliensis* J.Jacq. (Scrophulariaceae), verbaskosid 1 (IC₅₀ 1,3 ± 0,2 μM); isochinolinový alkaloid protoberberinového typu – berberin (IC₅₀ 145 ± 19 μM), izolovaný z extraktu oddenků *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae) nebo flavonoid bajkalin (IC₅₀ 12 ± 3 μM), izolovaný z kořenů *Scutellaria baicalensis* Georgi

(Lamiaceae) ^{[91][92][93]}. Z dalších alkaloidů můžeme uvést například isochinolinový alkaloid pavinanového typu – kalifornidin (IC_{50} $55,6 \pm 3,5 \mu M$), izolovaný z nadzemních částí a kořenů druhu *Eschscholzia californica* Cham. (Papaveraceae) nebo isochinolinový amarylkovitý alkaloid narcimatulin (IC_{50} $29,2 \pm 1,0 \mu M$), získaný z cibulí druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. ‘Dutch Master’ ^{[36][89]}. Přírodní inhibitory POP jsou uvedeny na následujícím obrázku – **Obrázek 17**.

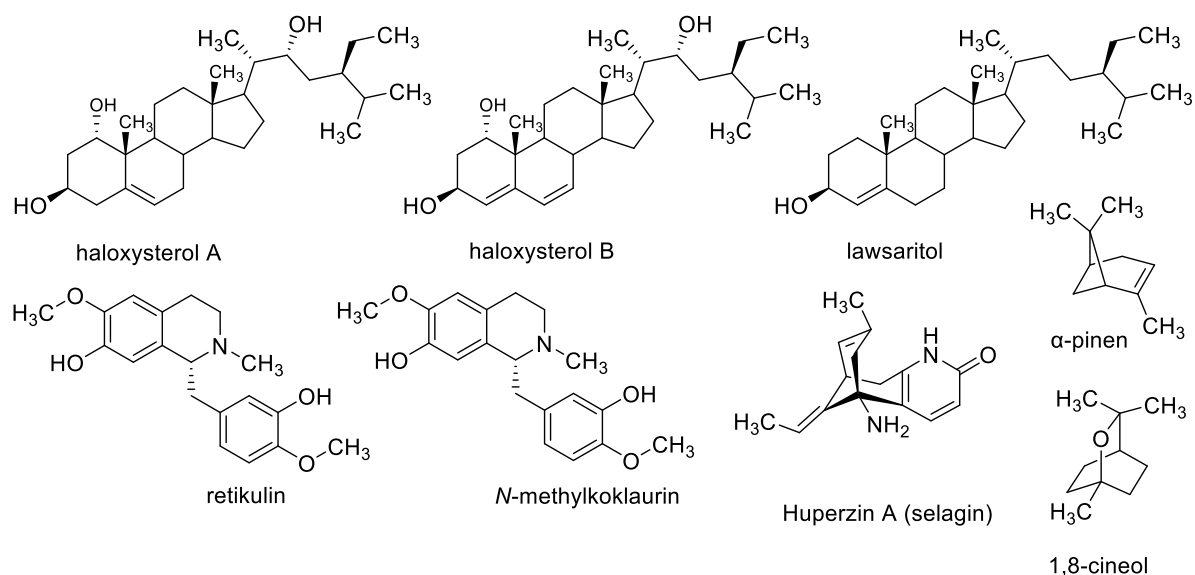


Obrázek 17 – Přírodní inhibitory prolyl oligopeptidasy ^{[89][90][91][92][93]}

4.2.1.5. Inhibitory cholinesteras

Z přírodních látek vykazují zajímavou inhibiční aktivitu vůči *huAChE* patří monoterpeny – 1,8-cineol (IC_{50} $0,67 \mu M$) a α -pinen (IC_{50} $0,63 \mu M$), které jsou součástí esenciálního oleje druhu *Salvia lavandulifolia* L. (Lamiaceae) ^[94]. Z dalších látek se zajímavou inhibiční aktivitou, vůči *eeAChE* a *eqBChE*, lze uvést například steroly obsažené v Pakistánském stromu *Haloxylon recurvum* Bunge ex Boiss. (Amaranthaceae) – haloxysterol A (*eeAChE* – IC_{50} $8,3 \pm 0,02 \mu M$; *eqBChE* – IC_{50} $4,7 \pm 0,01 \mu M$), haloxysterol B (*eeAChE* – IC_{50} $0,89 \pm 0,002 \mu M$; *eqBChE* – IC_{50} $2,3 \pm 0,01 \mu M$) a lawsaritol (*eeAChE* – IC_{50} $15,2 \pm 0,05 \mu M$; *eqBChE* – IC_{50} $3,9 \pm 0,06 \mu M$) nebo benzyloisochinolinové alkaloidy druhu *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) – retikulin (IC_{50} $33,6 \pm 3,0 \mu M$) a *N*-methylkoclaurin (IC_{50} $15,0 \pm 1,4 \mu M$), vykazující inhibiči vůči *huBChE* ^{[95][96]}. V neposlední řadě nelze také opomenout některé amarylkovité alkaloidy, které se vyznačují zajímavou aktivitou vůči ChE. Inhibiční aktivitu vůči *huBChE* prokázali belladinové alkaloidy – karltonin A (IC_{50} $0,91 \pm 0,02 \mu M$) a karltonin B (IC_{50} $0,031 \pm 0,00 \mu M$), vůči *eeAChE* zas některé lykorinové alkaloidy – 11-hydrohygalanthin (IC_{50} $0,67 \mu M$) a narcissidin (IC_{50} $1,85 \mu M$) ^{[29][34]}. Z galanthaminových alkaloidů vykazují aktivitu vůči *eeAChE* 11-hydroxygalanthamin (IC_{50} $1,61 \pm 0,21 \mu M$) a sanguinin (IC_{50} $0,10 \pm 0,01 \mu M$) ^[33]. Nelze

opomenout také alkaloid galanthamin, jehož inhibiční aktivita vůči lidským ChE je dostatečná k tomu, aby se mohl terapeuticky užívat k léčbě AD (*huAChE* – IC_{50} $1,70 \pm 0,10 \mu\text{M}$; *huBChE* – IC_{50} $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$) anebo seskviterpenový alkaloid – Huperzin A (*huAChE* – IC_{50} $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$), izolovaný z čínského mechu *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. (Lycopodiaceae), který je jako potravní doplněk dostupný ve formě tvrdých želatinových tobolek [36][97]. Přírodní inhibitory ChE jsou uvedeny na následujícím obrázku – **Obrázek 18**.



Obrázek 18 – Přírodní inhibitory cholinesteras [94][95][96]

5. Experimentální část – materiál, metody a přístrojové vybavení

5.1. Materiál použitý při separaci vzorku

5.1.1. Rozpouštědla

- Amoniak vodný roztok 24 % p.a. (Penta s.r.o.)
- Aceton p.a. (Penta s.r.o.)
- Cyklohexan p.a. (Penta s.r.o.)
- Diethylamin p.a. (Penta s.r.o.)
- Diethylether p.a. (Penta s.r.o.)
- Ethanol 95 %, denaturovaný methanolem, p.a. (Penta s.r.o.)
- n-Hexan p.a. (Penta s.r.o.)
- Chloroform p.a. (Penta s.r.o.)
- Toluén p.a. (Penta s.r.o.)

5.1.2. Chemikálie

- Dusičnan bismutitý zásaditý ČSL3 (Lachema n.p. Brno závod Neratovice)
- Chlorid rtuťnatý (Fisher Scientific s.r.o.)
- Jodid draselný p.a. (Penta s.r.o.)
- Kyselina chlorovodíková 35 % (Penta s.r.o.)
- Kyselina vinná p.a. (Penta s.r.o.)
- Síran sodný bezvodý p.a. (Lach-Ner s.r.o.)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Penta s.r.o.)

5.1.3. Detekční činidla

5.1.3.1. Dragendorffovo činidlo – zásobní roztok

Vzniká smísením roztoku A s roztokem B v objemovém poměru 1 : 1. Vzniklý zásobní roztok je možno uchovávat v lednici při teplotě 4 °C po dobu několika měsíců. Zásobní roztok ^[98]:

Roztok A:		Roztok B:	
Bazický dusičnan bismutitý	1,7 g	Jodid draselný	16,0 g
Kyselina vinná	20,0 g	Destilovaná voda	40,0 g
Destilovaná voda	80,0 g		

5.1.3.2. Dragendorffovo činidlo – detekční roztok

Vzniká smísením zásobního roztoku s kyselinou vinnou a destilovanou vodou. Roztok je možné uchovávat v lednici při teplotě 4 °C po dobu několika měsíců. Při vlastní detekci reaguje v roztoku

vzniklý tetrajodobismutitan draselný s terciárním dusíkem v molekule alkaloidů za vzniků komplexu obecného vzorce $[R_3NH][BiI_4]$, který je oranžový až mírně načervenalý ^[99]. Detekční roztok ^[98]:

Detekční roztok:

Zásobní roztok	5 ml
Kyselina vinná	10,0 g
Destilovaná voda	50,0 g

5.1.3.3. Mayerovo činidlo

Vzniká smísením 5,0 g jodidu draselného ve 30 ml destilované vody. Do vzniklého roztoku se přidá 1,35 g chloridu rtuťnatého. Vzniká sraženina jodidu rtuťnatého, která se po chvíli rozpouští za vzniku komplexní sloučeniny – tetraiodortuťnatan draselný; $K_2[HgI_4]$. Objem vzniklého roztoku se doplní destilovanou vodou na 100,0 ml. Výsledný roztok je čirý, nažloutlý, nanejvýš světle žluté barvy. Roztok je možné uchovávat v lednici při teplotě 4 °C po dobu několika měsíců ^[100].

Alkaloidy reagují v kyselém prostředí s tetraiodortuťnatanem draselným za vzniku komplexu obecného vzorce $[R_3NH]_2[HgI_4]$, což se projeví vznikem sraženiny, bílé až mírně nazelenalé barvy ^[99].

5.1.4. Stacionární fáze pro chromatografii na tenké vrstvě

Jako stacionární fáze pro preparativní tenkovrstvou chromatografii (pTLC) byl použit Silica gel GF₂₅₄ od firmy Merck s.r.o. Jedná se o zinkovaný silikát (Zn_2SiO_4) vykazující fluorescenci při $\lambda = 254$ nm. Silikagel byl nanesen ve formě suspenze na skleněné desky o rozměru 15 x 15 cm.

Jako stacionární fáze pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byl použit TLC Silica gel GF₂₅₄ od firmy Merck s.r.o. Rovněž se jedná o zinkovaný silikát (Zn_2SiO_4), který je již nanesen na hliníkové desce o rozměru 20 x 20 cm ve vrstvě o tloušťce 0,2 mm. Komerčně dodávané balení obsahuje 25 kusů těchto hliněných desek. Tento silikagel rovněž vykazuje fluorescenci při $\lambda = 254$ nm.

5.1.5. Mobilní fáze pro chromatografii na tenké vrstvě

V průběhu separačních prací se využilo celkem devatenáct různých mobilních fází, přičemž uvádím pouze pět, které byly bezprostředně použity k separaci. Zbylé mobilní fáze se na základě vykonaných TLC neprokázaly jako vhodné k užití při separaci.

MF_A – Toluén : Diethylamin = 95 : 5

MF_B – Toluén : Diethylamin = 90 : 10

MF_C – Toluén : *n*-Hexan : Diethylamin = 60 : 30 : 10

MF_D – Cyklohexan : Aceton : Amoniak = 65 : 35 : 2

MF_E – Toluén : Cyklohexan : Diethylamin = 50 : 50 : 5

5.1.6. Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John' s Manville (Sigma-Aldrich s.r.o.)

5.2. Přístrojové vybavení

- Vakuová rotační odparka Heidolph Laborta 4010 Digital (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- Vakuová rotační odparka Heidolph HEI-VAP Advantage. (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- Magnetická míchačka Heidolph MR3001 K (Heidolph Instruments GmbH & CO)
- Analytická váha KERN ABJ (max = 220 g, e = 1 mg; min = 10 mg, d = 0,1 mg) (KERN & SOHN GmbH)
- Laboratorní předvážka VWR Science Education (VWR International s.r.o.)
- GC-MS systém s GC zařízením typu 5975 inert MSD a MS detektorem typu Agilent Technologies 7890 (Agilent Technologies Inc.)
- Spektrometr Varian INOVA–500 NMR (Varian Inc.)
- Polarimetr P3000 (A.Krüss Optronic GmbH)

5.3. Rostlinný materiál

5.3.1. Droga pro přípravu extraktu

Zdrojem alkaloidního extraktu byly čerstvé cibule rostlin *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Dutch Master'. Cibule byly získány od firmy Lukon Glads s.r.o. (Sadská, Česká republika). Vzorky těchto cibulí jsou uchovávány v herbáriu Katedry farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod identifikačním číslem: CUFPH-16130/AL-262 ^[36].

5.3.2. Příprava extraktu

V rámci své doktorské práce, PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D., připravila prvotní alkaloidní extrakt. Pro získání extraktu bylo zpracováno 27,247 kg čerstvých cibulí a výslední extrakt měl hmotnost 58,25 g. Dr. Hulcová následně vykonala sloupcovou chromatografii a získala 301 frakcí, které byly spojeny do 16 společných podfrakcí. V rámci diplomové práce byla k dalším separačním pracím použita spojená podfrakce č. 82 – 94 ^[36].

5.4. Metody použité při separaci vzorku

5.4.1. Destilace

Metodou destilace byla, před vlastním použitím, přečištěna všechna použitá rozpouštědla. Následně byla všechna předestilovaná rozpouštědla uchovávána ve tmavých, skleněných, širokohrdlých lahvích nebo plechových kanystrech, které byly uloženy v kovové skřínce.

5.4.2. Preparativní chromatografie na tenké vrstvě

Tato metoda slouží k separaci alkaloidních nebo jiných směsí na jednotlivé alkaloidy. Principem metody je rozdílná afinita různých alkaloidů k dané stacionární a mobilní fázi. Dalším významným faktorem pro úspěšnou separaci je také polarita jednotlivých složek mobilní fáze.

Při této separační metodě představuje stacionární fázi vrstva silikagelu naneseného na skleněné desce o rozměru 15 x 15 cm. Desky pro pTLC (syn. litá deska) se připravují nalitím suspenze (6,5 g silikagelu a 20,0 ml destilované vody) na skleněnou desku, která se po dobu minimálně jednoho dne ponechá schnout.

Následně se pomocí pera pro pTLC v tenké linii nanese vzorek na desku a nechá se pár minut zaschnout. Maximální množství vzorku, které by mělo být nanášeno na jednu litou desku, tak aby byly zachovány ideální podmínky separace, je přibližně 40,0 mg (ideální rozsah je mezi 30,0 – 40,0 mg).

Lité desky se následně vyvíjejí v komorách s mobilní fází. Komory je před vlastní separací nutno ponechat nasycit parami mobilní fáze. Sycení probíhá po dobu alespoň třiceti minut.

Po ukončení vyvíjení se lité desky nechají odstát, nebo se vysuší horkým vzduchem, aby se vypařila zbylá mobilní fáze. Následně se vykoná detekce pomocí UV lampy při $\lambda = 254$ nm a Dragendorffova činidla, podle které dále izolujeme jednotlivé zóny obsahující alkaloidy. Na základě detekce se pomocí preparační jehly označí zóny obsahující alkaloidy a následně se silikagel, obsahující separovanou část vzorku, mechanicky odstraní z desky.

5.4.3. Eluce

Metoda slouží k oddělení alkaloidů od silikagelu, který se zachycuje ve vatě.

Materiál získaný vyškrabáním silikagelu z desky se mísí s křemelinou v poměru 1 : 1. Takto vzniklá směs se následně, přes vrstvu vaty, přemyje pomocí směsi rozpouštědel – chloroform : ethanol = 1 : 1. Eluce je ukončena v momentě, kdy detekce pomocí Dragendorffova činidla neprokáže přítomnost alkaloidů v rozpouštědle.

5.4.4. Odpařování pomocí vakuové rotační odparky

Podstatou metody je oddestilování rozpouštědel, z alkaloidního extraktu získaného elucí za snížené teploty a tlaku. V přítomnosti vakua se snižuje teplota varu rozpouštědel v důsledku čehož, není nutné temperovat vodní lázeň na vysokou teplotu. Teplota vodní lázně se pohybovala od 30 °C do 50 °C. Odpařování pomocí vakuové rotační odparky (RVE) probíhalo při rychlosti rotace v rozmezí 70 – 100 rpm.

5.4.5. Extrakce v děličce – „vytřepávání“

Podstatou metody je přechod organických molekul z vodního roztoku do organického rozpouštědla za současného odstranění přebytečných balastních látek (například různé druhy sacharidů, tuky, vosky, barviva nebo pryskyřice).

Alkaloidní extrakt se rozpustí ve zředěné 5% kyselině chlorovodíkové a přenesení se do dělicí nálevky. pH alkaloidního vodného roztoku by se mělo pohybovat kolem hodnoty $pH \cong 2$. V této fázi alkaloidy z extraktu přecházejí do vodního roztoku ve formě jejich chloridů a tím se zamezí jejich přechodu do organické fáze.

Následně se kyselá, vodní fáze protřepe tři–čtyřikrát s dostatečným množstvím diethyletheru¹³, čímž se odstraní zbylé balasty v něm rozpustné tzv. se odtuční. Organická fáze diethyletheru se pak jímá do samostatné kádinky a již se dále nepoužívá.

Zbylá vodní kyselá alkaloidní frakce se následně zalkalizuje prostřednictvím 10% roztoku uhličitanu sodného na $pH \cong 9 - 10$. Alkalizaci roztoku se vytěsní alkaloidy z jejich chloridů a stanou se neionizované. Tato forma alkaloidů již snadno může přejít při dalším dělení do organické fáze.

Následně se bazická, vodní fáze protřepe tři–čtyřikrát s dostatečným množstvím chloroformu¹⁴. Neionizované alkaloidy přecházejí do organické fáze chloroformu, která se jímá do samostatné baňky. K chloroformové frakci se přidá adekvátní množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranila přebytečná voda. Následně se chloroformová frakce zfiltruje přes vatu nebo papírový filtr a odpaří se pomocí RVE.

Zbylá vodní bazická fáze může ještě obsahovat nějaké množství alkaloidů. Z tohoto důvodu se vykonává detekce pomocí Mayerova činidla. Pokud se ve vzorku vodní fáze objeví bílý až mírně nazelenalý zákal nebo sraženina (pozitivní reakce), je zbylou vodní fázi nutno opětovně protřepat pomocí chloroformu a následně vykonat další detekci pomocí činidla.

5.4.6. Rekrystalizace

Rekrystalizace je jednou z metod, které slouží k purifikaci látek. Podstatou metody je schopnost látek vykristalizovat z jejich nasycených roztoků, které mohou být zahřáté na vyšší teplotu, nebo jsou schopny rekrystalizovat za laboratorní teploty.

¹³ Množství diethyletheru je závislé od množství vzorky. V našem případě se použilo $\approx 20,0$ ml.

¹⁴ Množství chloroformu je rovněž závislé od množství vzorky. Bylo použito $\approx 20,0$ ml.

5.4.6.1. Rekrystalizace pod zpětným chladičem

V našem případě se jako rozpouštědlo použila směs chloroform¹⁵ : ethanol = 1 : 1. Takto připravený alkaloidní roztok se umístil na vodní lázeň pod Dimrothův spirálový chladič, kde byl ponechán přibližně jednu hodinu, aby se patřičně ohřál a nasýtil. Část rozpouštědla se odpařila otvorem na vrchu chladiče, část kondenzovala na jeho vnitřní spirále a vrátila se zpět do roztoku.

Když byl alkaloidní roztok patřičně nasycen a zahuštěn, tak se umístil do chladu (mrazák), kde byl rychle ochlazen – tzv. rušená krystalizace. Následně se odsál zbylý matečný louh a krystaly byly ještě dočištěny promytím pomocí malého množství chloroformu přes fritu.

5.4.6.2. Rekrystalizace odpařením rozpouštědla

Při tomto typu rekrystalizace se alkaloidní roztok, o stejném složení solventu, nezahřívá na vodní lázni, ale ponechá se odložen na místě bez přístupu světla k samovolnému odpaření rozpouštědla. Při postupném odpařování rozpouštědla se roztok koncentruje a stává se nasyceným. Z takto nasyceného roztoku vypadávají krystaly alkaloidů, které se zpracují jako v předchozím případě.

5.5. Metody použité při strukturní analýze

5.5.1. Analýza pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Pro zjištění identity izolovaných alkaloidů na základě jejich hmotnostního spektra byla využita GC-MS analýza na plynovém chromatografu typu 5975 inert MSD s hmotnostním spektrometrem typu Agilent Technologies 7890A a hmotnostním kvadrupólovým analyzátozem jako detektorem. Plynový chromatograf využívá metodu EI (tvrdá ionizační technika) pro ionizaci analytů pomocí energie o velikosti 70 eV. Využita byla analytická kolona typu DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Jako nosní plyn bylo vybráno helium při průtokové rychlosti 0,8 ml/min ^[36].

Teplota při separaci dosáhla hodnoty 300 °C. Teplota od 100 °C do 180 °C se temperovala rychlostí 15 °C/min. Po dosažení teploty 180 °C byla tato teplota udržována po dobu jedné minuty. Teplota od 180 °C do 300 °C se temperovala rychlostí 5 °C/min. Po dosažení teploty separace – 300 °C, byla tato teplota udržována po dobu čtyřiceti minut ^[36].

Injektor, který nastříkuje do přístroje vzorek o velikost 1 μl ve 'split mode' o poměru 1 : 15, byl vytemperován na teplotu 280 °C. Detektor byl temperován na 200 °C a jeho detekční rozmezí bylo m/z 40 – 600 ^[36].

¹⁵ Jako alternativa chloroformu byl využit také *n*-hexan.

5.5.2. Analýza pomocí vodíkové nukleární magnetické rezonance

¹H NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie panem doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, Ph.D. Vodíková NMR spektra se měřila na spektrometru Varian INOVA-500 NMR. Při měření byla použita sonda typu 5mm ID PGF o pracovní frekvenci 500 MHz, za teploty o velikosti 25 °C. Jako rozpouštědlo byl použit CDCl₃ (deuterovaný chloroform) [36].

5.5.3. Analýza pomocí uhlíkové nukleární magnetické rezonance

¹³C NMR spektra byla rovněž, změřena panem doc. Kunešem na příslušné katedře, stejným typem přístroje za stejné teploty a typu rozpouštědla. Při měření uhlíkových NMR spekter se na rozdíl od vodíkových použila širokopásmová sonda typu 5 mm SW při pracovní frekvenci o velikosti 125,7 MHz [36].

5.5.4. Polarimetrie

Optická otáčivost získaných alkaloidů byla měřena pomocí polarimetru P3000. Alkaloidy byly před vlastním měřením rozpuštěny v chloroformu. Následně se podle níže uvedeného vzorce vypočetla specifická otáčivost, která následně byla porovnána s odbornou literaturou.

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}^{16}$$

Rovnice 1 – Výpočet specifické otáčivosti [101]

5.6. Materiál a přístroje použité při stanovení biologické aktivity

Veškerý materiál a přístroje pro stanovení biologické aktivity, které jsou uvedené v práci, byly použity podle (Hulcová, a další, 2019) [36].

5.6.1. Stanovení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám

5.6.1.1. Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid ≥ 99,0 % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Butyrylthiocholin jodid ≥ 99,0 % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Dimethylsulfoxid ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98 %; DTNB (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Huperzin A 95 % (TAZHPNGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co. Ltd.)
- Galanthamin hydrobromid 95 % (Changsha Organic Herb Inc.)

¹⁶ t – teplota měření [°C]; D – čára sodíkového dubletu (λ = 589,3 nm); α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace látky (alkaloidu) [g × ml⁻¹]; l – optická dráha „délka květy“ [dm] [101].

5.6.1.2. Tlumivé roztoky – pufry

- PBS₁ (c = 5 mM; pH = 7,4)
- PBS₂ s příměsí 150 mM NaCl (c = 5 mM; pH = 7,4)

5.6.1.3. Přístrojové vybavení

- Jednokanálový reader mikrotitračních destiček Reader Synergy™ HT Multi – Detection Microplate Reader (BioTek Instruments Inc.)
- Centrifuga Boeco U-320R s rotorem Hettich 1611 (Boeckel & CO GmbH & CO)

5.6.1.4. Stanovované enzymy a jejich původ

Zdrojem lidských cholinesteráz byla čerstvě odebraná lidská krev zdravých dobrovolníků, která byla obohacena o 2 ml 3,4% citrátu sodného (*in vitro* protisrážlivé činidlo). Krev byla následně rozdělena do zkumavek po pěti mililitrech. Bezprostředně po přerozdělení do zkumavek byla krev centrifugována po dobu deseti minut při 4000 rpm za teploty 4 °C. Separát plazmy obsahující *huBChE*, oddělen od zbylého krevního sedimentu, byl až do využití skladován při teplotě 4 °C po dobu maximálně šesti hodin [36].

Zbýlý krevní sediment byl pročištěn pomocí bezpopelného filtru. Následně se přidalo také množství PBS₂ tak, aby výsledný objem suspenze byl 13 ml. Opětovně se vykonala centrifugace a následně se za účelem dokonalého odstranění plazmy vykonalo trojnásobné promytí centrifugované suspenze pomocí PBS₂. Následně se přidával PBS₁, a to v množství potřebném ke vzniku výsledného poměru erythrocyty : PBS₁ = 1 : 9, který je schopen vyvolat hemolýzu erythrocytů při které se z nich uvolňuje *huAChE*. Výsledná směs byla přelita do Erlenmayerovy baňky a za pomoci magnetické míchačky byla po dobu deseti minut, za rychlosti otáček 300 rpm ponechána spontánní hemolýze. Následně byla probíhající hemolýza zastavena a stanovila se aktivita vzniklého hemolyzátu, který byl až do momentu využití skladován při teplotě -22 °C [36].

5.6.2. Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase

5.6.2.1. Chemikálie

- Dimethylsulfoxid ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Berberin 95 % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Z-Gly-Pro-p-nitroanilid (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Z-Pro-prolinal ≥ 98 % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- 1,4-dioxan (Lachema n.p. Brno závod Neratovice)

5.6.2.2. Tlumivé roztoky – pufry

- PBS₃ (c = 0,01 M; pH = 7,4) o složení 173 mM NaCl a 2,7 mM KCl

5.6.2.3. Přístrojové vybavení

- Vertikální jednokanálový ELISA Reader ELx800, (BioTek Instruments Inc.)

5.6.2.4. Stanovovaný enzym

- Rekombinantní prolyl oligopeptidasa (Sigma-Aldrich s.r.o.)

5.6.3. Stanovení inhibiční aktivity vůči glykogensyntase kinase 3 β

5.6.3.1. Chemikálie

- Dimethylsulfoxid $\geq 99,5$ % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina; HEPES $\geq 99,5$ % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Ethylendioxytetraoctová kyselina; EDTA (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Tetrasodná sůl ethylenglykol-bis(-aminoethylether) – N,N,N,N-tetraoctové kyseliny; EGTA $\geq 99,05$ % (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Magnezium acetát (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Adenosintrifosfát (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- GSM (Merck Millipore Inc.)
- SB-415286 (Selleck Chemicals Inc.)
- Souprava Kinase-Glo[®] Luminiscent Kinase Assays (Promega Biotech Co., Ltd.)

5.6.3.2. Přístrojové vybavení

- Fluorescenční detektor Victor X3 multimode plate reader (BioTek Instruments Inc.)

5.6.3.3. Stanovovaný enzym

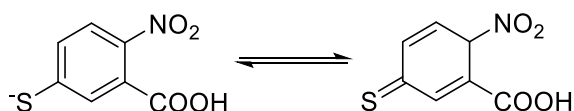
- GSK-3 β (Merck Millipore Inc.)

5.7. Metody použité při stanovení biologické aktivity

5.7.1. Metoda stanovení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám

Pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči lidským cholinesterázám byla využita kolorimetrická metoda podle George L. Ellmana, využívající specifické činidlo – DTNB.

Podstatou metody je enzymová hydrolýza thiocholin jodidů (acetylthiocholin jodid; butyrylthiocholin jodid) za účasti AChE a BChE. Po hydrolýze se thiocholin štěpí na příslušnou karboxylovou kyselinu a thiocholin, který ve své molekule obsahuje thiolovou skupinu, jež reaguje s DTNB (Ellmanovo činidlo) za současného uvolnění 5-merkpto-2-nitrobenzoového aniontu TNB⁻. Tautomer aniontu TNB⁻ je žluté barvy a je snadno detekovatelný spektrofotometricky ^[102].



Obrázek 19 – Tautomerní formy 5-merkaptu-2-nitrobenzoového aniontu ^[102]

Na počátku bylo do jamek mikrotitrační destičky napipetováno 8,3 μ l plazmy (stanovení pro *huBChE*) nebo hemolyzátu erytrocytů (stanovení pro *huAChE*). Následně se přidalo 283,0 μ l DTNB ($c = 5$ mM) a 8,3 μ l roztoku obsahující příslušný alkaloid rozpuštěn v DMSO v klesající koncentrační řadě (40,0 mM; 10,0 mM; 4,0 mM; 1,0 mM; 0,4 mM). Jako blanc byl využit samotný DMSO v množství 8,3 μ l. Proběhla pětiminutová inkubace při 37 °C v přístroji Reader SynergyTM HT Multi a následně bylo přidáno 33,3 μ l roztoku příslušných thiocholin jodidů o $c = 10$ mM a proběhla, již výše popsaná, hydrolyzační reakce. Vzniklý tautomer aniontu TNB⁻ byl detekován spektrofotometricky při $\lambda = 412$ nm pro stanovení *huBChE* a $\lambda = 436$ nm pro stanovení *huAChE* ^[36]. Procentuální inhibice byla vypočtena dle následující rovnice:

$$[\%] I = 100 - \frac{\Delta A_{BL}}{\Delta A_{SA}} \times 100$$
 ¹⁷

Rovnice 2 – Výpočet procentuální inhibice alkaloidů vůči lidské acetyl- a butyrylcholinesterase ^[36]

Následně se ze získaných hodnot za pomoci programu GraphPad Prism (ver. 5.02) a nelineární regrese, vypočetla hodnota IC₅₀ [μ M], která byla porovnána s referenčními látkami (galanthamin a Huperzin A) ^[36].

5.7.2. Metoda stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase

POP byla rozpuštěna v PBS₃. Alkaloidy byly rozpuštěny v DMSO v takovém množství, aby vznikli zásobní roztoky o $c = 10$ mM. Následně se ředěním zásobních roztoků pomocí demineralizované vody připravila koncentrační řada alkaloidních roztoků (10^{-3} , 10^{-7} M). Jako blanc byl použit DMSO o stejné koncentraci, jakou měli roztoky koncentrační řady ^[36].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 5 μ l testovaného roztoku z koncentrační alkaloidní řady, 5 μ l roztoku POP a 170 μ l PBS₃. Získaná směs se při teplotě 37 °C inkubovala po dobu pěti minut. Substrát (*Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilid) se připravil rozpuštěním v 50% 1,4-dioxanu a byl přidán v množství 20 μ l k inkubované směsi. Pak proběhla další třicetiminutová inkubace při teplotě 37 °C, při které vznikly barevné produkty *p*-nitroanilinu. Vzniklé žluté produkty byly spektrofotometricky změřeny ve vertikálním jednokanálovém ELISA readeru ELx800 při $\lambda = 405$ nm ^[36].

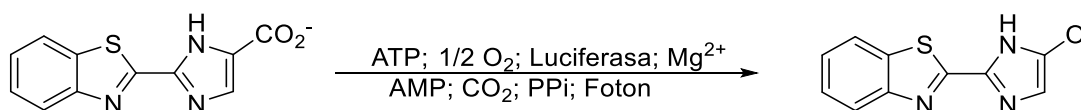
¹⁷ ΔA_{BL} – nárůst absorbance slepé vzorky za jednu minutu; ΔA_{SA} – nárůst absorbance měřené vzorky za jednu minutu ^[36].

Vztah mezi množstvím vzniklého žlutého produktu a aktivitou POP je přímo úměrný. To znamená, že čím vyšší je aktivita POP, tím více žlutého produktu vznikne. Z toho plyne, že čím větší množství žlutého produktu vznikne, tím menší je potenciál alkaloidu inhibovat POP. Inhibiční aktivita vůči POP se za pomoci programu GraphPad Prism (ver. 5.02) vyjádřila jako hodnota IC_{50} [μ M] a získané hodnoty byly porovnány s referenčními látkami (berberin; Z-Pro-prolinal) [36].

5.7.3. Metoda stanovení inhibiční aktivity vůči glykogensyntase kinase 3 β

Pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči GSK-3 β byla využita luminiscenční metoda podle (Baki, Bielik, Molnár, Szendrei, & Keserü, 2007) [103], za využití soupravy činidel Kinase-Glo [104].

Souprava Kinase-Glo obsahuje jako substrát hmyzí luciferin a rekombinantní enzym – luciferasa (oxidoreduktáza katalyzující oxidaci pigmentu luciferinu na oxyluciferin), který pro svou oxidační činnost vyžaduje přítomnost ATP, které nebylo v reakci spotřebováno GSK-3 β kinasou. Při této oxidační reakci se emitují fotony, které jsou ve formě luminiscence zachyceny detektorem [104].



Obrázek 20 – Oxidační aktivita enzymu luciferasa [104]

Metoda probíhá na mikrotitračních destičkách s devadesáti šesti jamkami. Do každé jamky se nadávkuje 10 μ l testovaného roztoku alkaloidu rozpuštěného v DMSO o $c = 1$ mM, který byl předem zředěný na požadovanou koncentraci pomocí tlumivého roztoku (pH = 7,4) o kvalitativním složení: 50 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1mM EDTA a 15 mM magnézium acetátu. Dále se přidá 10 μ l ATP, 10 μ l GSM (substrát pro GSK-3 β) o $c = 100$ μ M a 10 μ l GSK-3 β odpovídající množství o hmotnosti 20 ng. Pozitivní a negativní kontrola se vykonala pomocí tlumivého roztoku SB-415286 (pozitivní standard) o finální $c = 5$ μ M. DMSO by neměl být ve větším množství, než je 5 % z celkového množství směsi [36].

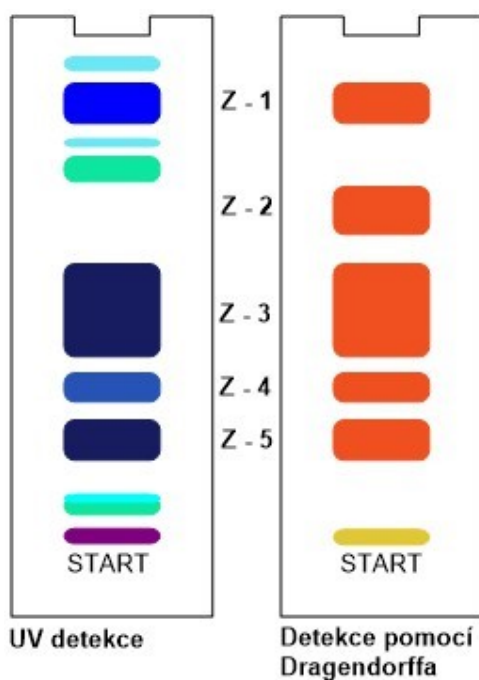
Výsledná směs se inkubovala po dobu třiceti minut při teplotě 37 °C. Následně se inkubace zastavila pomocí 40 μ l soupravy Kinase-Glo. Následně se po deseti minutách odečetla výsledná luminiscence. Inhibiční aktivita se vypočetla na základě maximální aktivity, která se měřila při absenci inhibitoru v reakční směsi, a maximální inhibice, která se měřila v přítomnosti referenční substance. Výsledná inhibiční aktivita je proporcionální k rozdílu celkové a spotřebované ATP [36].

Vztah mezi velikostí luminiscence a aktivitou kinázy je nepřímo úměrný. To znamená, že čím vyšší je intenzita luminiscence, tím nižší je aktivita GSK-3 β . Z toho plyne, že čím vyšší je luminiscence, tím větší je potenciál alkaloidů inhibovat GSK-3 β . Inhibiční aktivita vůči GSK-3 β se za pomoci programu GraphPad Prism (ver. 5.02) vyjádřila jako hodnota IC_{50} [μ M] a získané hodnoty byly porovnány s referenční látkou (SB-415286) [36].

6. Experimentální část – vlastní metodika izolace alkaloidů

Pro izolaci alkaloidů byly použity frakce alkaloidního extraktu č. 82 – 94 o hmotnosti 2,3268 g.

Z extraktu bylo odebráno nepatrné množství, které bylo rozpuštěno v chloroformu za účelem přípravy vzorku pro TLC a následně se vyvíjelo dvakrát v MF_A. UV detekce ($\lambda = 254 \text{ nm}$) prokázala přítomnost pěti samostatných zón obsahujících látky povahy alkaloidů. Po následné vizualizaci pomocí Dragendorffova činidla se rozhodlo, že se alkaloidy z extraktu budou pomocí pTLC izolovat v pěti samostatných zónách.

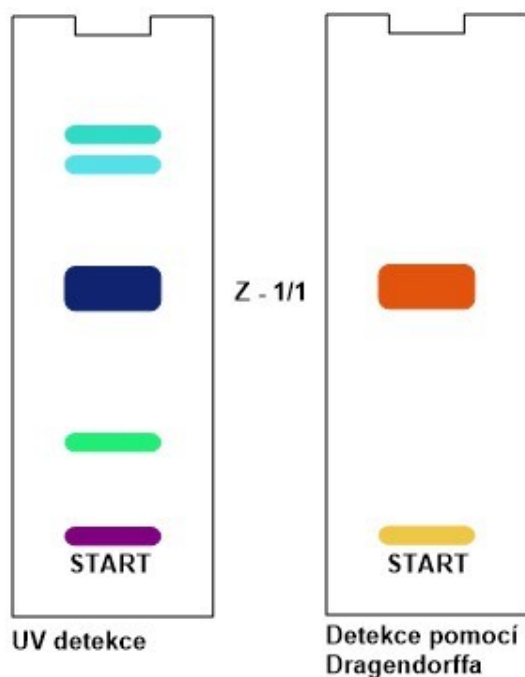


Obrázek 21 – TLC spojené podfrakce č. 82 – 94

Následně byl celý extrakt č. 82 – 94 rozdělen na tři části a každá část byla postupně rozpuštěna v potřebném množství chloroformu a pomocí pera pro pTLC byl nanesen na předem připravené lité desky. Počet litých desek nutných pro separaci celého extraktu byl 64. Prvotní separace probíhala ve třech sériích (22; 22; 20 litých desek). Desky byly dvakrát vyvinuty ve soustavě MF_A. Následně se z desek nechala odpařit zbylá mobilní fáze a pak byly desky zkontrolovány pomocí UV lampy při $\lambda = 254 \text{ nm}$. Detekce prokázala výskyt pěti samostatných zón obsahujících alkaloidní substance, které byly shodné s předem připraveným TLC. Následná detekce pomocí Dragendorffova činidla rovněž prokázala výskyt pěti zón shodných s předchozím TLC. Zóny ze všech tří sérií se shodným R_f byly vyškrabány z desek a spojeny do jedné baňky. Následně se provedla eluce, odpaření pomocí RVE a pod označením Z – (1-5) byly vzorky odloženy do lednice k další separaci.

6.1. Zóna Z – 1

Pro zjištění vhodné mobilní fáze k další separaci bylo odebráno nepatrné množství extraktu, které bylo rozpuštěno v chloroformu. Po zjištění vhodné mobilní fáze pro další separaci zóny Z – 1 byla tato zóna přečištěna pomocí pTLC na pěti litých deskách. Zóna Z – 1 byla dvakrát vyvinuta v MF_E.



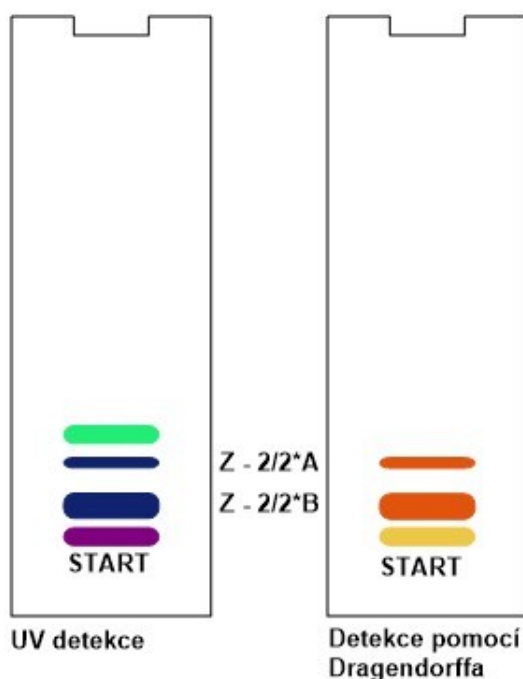
Obrázek 22 – TLC podfrakce Z – 1

Po vyškrabání, následné eluci a odpaření extraktu na RVE bylo možné na stěně baňky pozorovat krystalky alkaloidů. Dále byl extrakt dočištěn pomocí samovolné krystalizace, pojmenován jako Z – 1/1 a uchován v lednici k další analýze. Výsledky strukturální analýzy jsou uvedeny v podkapitole Zóna Z – 1/1.

6.2. Zóna Z – 2

Zóna Z – 2 byla pomocí mobilní fáze MF_D (dvakrát vyvinuto) na osmi litých deskách separována na dvě samostatné zóny – zóna Z – 2/1 a zóna Z – 2/2. Po následné detekci pomocí Dragendorffova činidla a vzhledem k vyššímu očekávanému výtěžku separace se dále pracovalo pouze se zónou Z – 2/2.

Opětovně se připravil vzorek a byla nalezena vhodná mobilní fáze pro pTLC pro zónu Z – 2/2. Zóna Z – 2/2 byla rozpuštěna v adekvátním množství chloroformu a nanesena pomocí pera na lité desky. Šest litých desek bylo dva-krát vyvinuto v mobilní fázi MF_D.



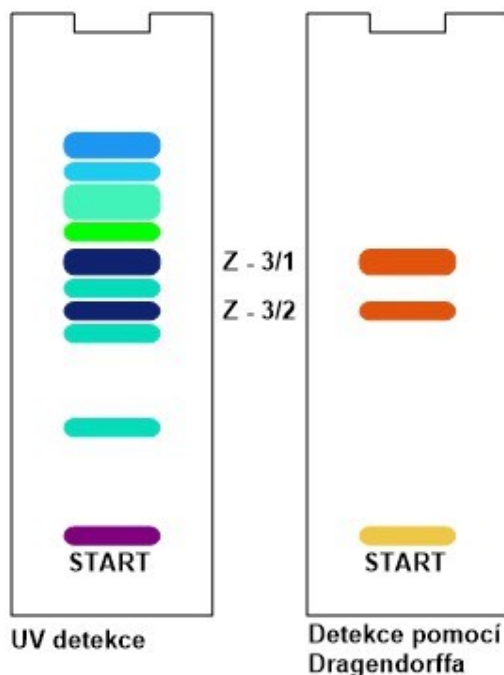
Obrázek 23 – pTLC podfrakce Z – 2/2

Byly nalezeny dvě samostatné zóny, které byly vyškrabány, eluovány a následně odpařeny. Extrakty byly označeny jako zóna Z – 2/2*A, a zóna Z – 2/2*B. Vzhledem k velice nízkému výtěžku ze zóny Z – 2/2*A se dále pracovalo pouze se zónou Z – 2/2*B.

Zóna Z – 2/2*B obsahovala kromě vykrystalizovaného alkaloidu také značné množství balastních látek a nepatrné množství vody. Z důvodu obsahu vody v extraktu a očekávaného odstranění balastů se extrakt pročistil pomocí vytřepávání v děličce. Za pomoci RVE byl chloroformový extrakt odpařen a na stěně baňky bylo možno pozorovat vznikající čisté krystalky alkaloidu. Separát byl následně pojmenován jako zóna Z – 2/2*B, zabalen a uchován v lednici k další analýze. Výsledky strukturální analýzy jsou uvedeny v podkapitole [Zóna Z – 2/2*B](#).

6.3. Zóna Z – 3

Pro odstranění nadbytečného balastu byla zóna Z – 3 odtučněna vytřepáním v děličce. Následně se připravil vzorek pro TLC, který se vyvíjel dvakrát v mobilní fázi MF_C. Zóna Z – 3 byla celá rozpuštěna v adekvátním množství chloroformu a převedena pomocí pera na 24 litých desek, které se vyvíjeli dvakrát v mobilní fázi MF_C. Následní UV detekce odhalila osm samostatných zón. Detekce pomocí Dragendorffova činidla potvrdila přítomnost alkaloidů pouze ve dvou samostatných zónách. Následně byly tyto zóny vyškrabány, eluovány a odpařeny na RVE.



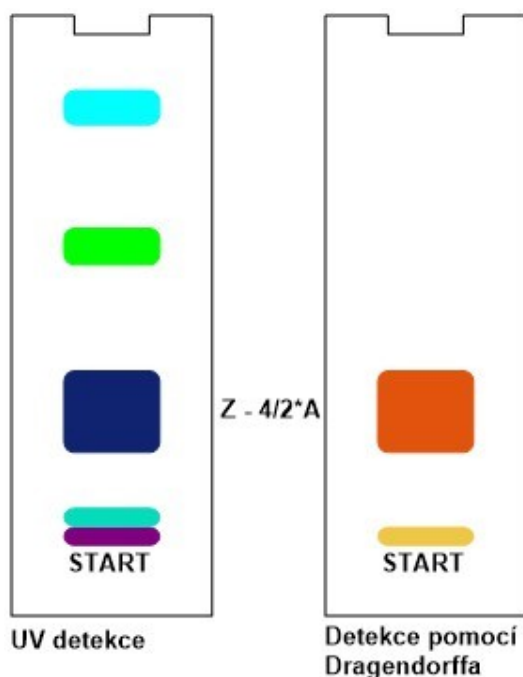
Obrázek 24 – TLC podfrakce Z – 3

Vzhledem na vyšší očekávaný výtěžek separace se dále zpracovávala pouze zónou Z – 3/1, která byla rozpuštěna v chloroformu a nanesena na čtrnáct litých desek a ty se dvakrát vyvíjeli v MF_C. Byla získána jedna samostatná zóna, která obsahovala alkaloidní látky a ta byla vyškrabána, eluována a odpařena. Dále se vykonala rekrystalizace pod zpětným chladičem za pomoci n-hexanu, chloroformu a ethanolu v objemovém poměru 1 : 1 : 1. Po odsátí zbylého matečného louhu byly získané relativně čisté krystaly alkaloidu, které byly ještě promyty malým množstvím chloroformu přes fritu. Separát byl následně pojmenován jako zóna Z – 3/1*A, zabalen a uchován v lednici k další analýze. Výsledky strukturální analýzy jsou uvedeny v podkapitole Zóna Z – 3/1*A.

6.4. Zóna Z – 4

Po připravení vzorku pro TLC byla následně nalezena vhodná mobilní fáze pro separaci pomocí pTLC. Zóna Z – 4 byla rozpuštěna v adekvátním množství chloroformu a pomocí pera nanášena na lité desky. Počet litých desek nutných k separaci zóny Z – 4 byl dvanáct. Desky se vyvíjely dvakrát v soustavě MF_C. Byly nalezeny dvě samostatné zóny obsahující alkaloidy, které byly následně vyškrabány, eluovány a za pomoci RVE odpařeny. Získané extrakty byly pojmenovány jako zóna Z – 4/1 a zóna Z – 4/2. Vzhledem k většímu hmotnostnímu výtěžku se dále pracovalo pouze se zónou Z – 4/2.

Zóna Z – 4/2 byla přečištěna na šesti litých deskách. Vyvíjení proběhlo dvakrát v mobilní fázi MF_C. Po následné detekci pomocí UV lampy a Dragendorffova činidla byla nalezena jedna samostatná zóna obsahující alkaloidy. Následně byla daná oblast vyškrabána, eluována a odpařena na vakuové rotační odparce. Získaný extrakt byl pojmenován jako zóna Z – 4/2*A.

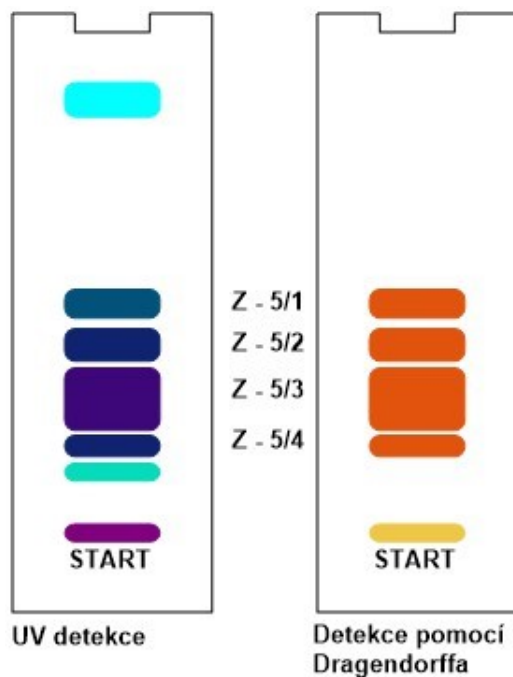


Obrázek 25 – TLC podfrakce Z – 4/2

Vzhledem k obsahu balastních látek bylo pro zónu Z – 4/*A zvoleno přečištění pomocí vytřepávání v děličce. Po odpaření chloroformové frakce byly na stěně banky pozorovány vykryštalizované krystalky alkaloidů. Následně se vykonala rekrystalizace pod zpětným chladičem pomocí chloroformu a ethanolu v jednotkovém poměru. Pak se získané krystalky zfiltraly přes fritu pomocí malého množství chloroformu. Separát byl následně pojmenován jako zóna Z – 4/2*A, zabalen a uchován v lednici k další analýze. Výsledky strukturní analýzy jsou uvedeny v podkapitole Zóna Z – 4/2*A.

6.5. Zóna Z – 5

Podle připraveného vzorku pro TLC se za nejvhodnější mobilní fázi zvolila MF_B. Následně se celá zóna Z – 5 rozpustila v adekvátním množství chloroformu a byla pomocí pera převedena na deset litých desek, které se v MF_B vyvíjely dvakrát. Následná UV detekce prokázala výskyt sedmi zón. Z těchto zón bylo po následné detekci pomocí Dragendorffova činidla zjištěno, že pouze čtyři zóny obsahují látky alkaloidní povahy. Všechny čtyři zóny byly následně vyškrabány, eluovány a odpařeny. Získané extrakty byly pojmenovány jako zóna Z – 5/1, zóna Z – 5/2, zóna Z – 5/3 a zóna Z – 5/4.



Obrázek 26 – TLC podfrakce Z – 5

Vzhledem ke značně nízkému hmotnostnímu výtěžku ze zón Z – 5/1, Z – 5/2 a Z – 5/4 se k další separaci použila pouze zóna Z – 5/3.

Následně se zóna Z – 5/3 zbavila balastů vytřepáním v děličce a po rekrystalizaci pod zpětným chladičem byly získané krystalky alkaloidu. Následně byly dočištěny přes fritu pomocí malého množství chloroformu. Separát byl následně pojmenován jako zóna Z – 5/3*A, zabalen a uchován v lednici k další analýze. Výsledky strukturní analýzy jsou uvedeny v podkapitole Zóna Z – 5/3*A.

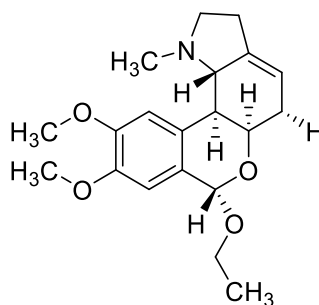
7. Výsledky strukturní analýzy alkaloidů

Na základě níže uvedených použitých chromatografických, spektrálních a optických metod se podařilo identifikovat všech pět získaných alkaloidních substancí, a to jako *O*-ethyllykorenin, epigalanthamin, galanthamin, galanthin a krinin.

Všechna získaná GC-MS spektra byla porovnána s odbornou literaturou a sbírkou standardů, které jsou dostupné na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Naměřené ^1H , ^{13}C NMR spektra a optická otáčivost byly rovněž porovnány s odbornou literaturou. Molekulové hmotnosti jednotlivých molekul byly generovány v programu ChemDraw (ver. 19.1).

7.1. Zóna Z – 1/1

Neznámá látka ze zóny Z – 1/1 byla pozitivně identifikována jako homolykorinový alkaloid **O-ethyllykorenin**. Výsledky *in vitro* testů na inhibiční aktivitu vůči *huAChE*, *huBChE*, POP a GSK-3 β jsou uvedeny v kapitole **Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči *in vitro* testovaným enzymům**.



Obrázek 27 – O-ethyllykorenin [36]

Molekulová hmotnost

$$M_r = 345,44$$

GC-MS spektrum

EI – MS (*m/z*) 345(-); 300(2.3) 191(7) 109(100) [105].

¹H NMR spektrum

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.24 (1H, d, *J* = 4.80 Hz, H-1), 2.44 (1H, d, *J* = 1.40, H-2), 5.50 (1H, s, H-3), 2.43 (1H, d, *J* = 1.42 Hz, H-4a), 5.51 (1H, s, H-6), 6.86 (1H, s, H-7), 6.97 (1H, s, H-10), 2.43 (1H, s, H-10b), 2.45 (2H, m, H-11), 3.17 (1H, s, H-12), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 2.43 (2H, q, *J* = 9.05, 1.45 Hz, OCH₂CH₃), 2.31 (3H, t, *J* = 2.50 Hz, OCH₂CH₃), 2.08 (3H, s, NCH₃) ppm [106].

¹³C NMR spektrum

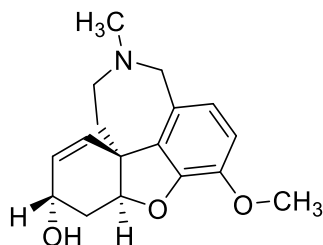
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 66.7 (C-1), 31.7 (C-2), 116.1 (C-3), 138.6 (C-4), 67.7 (C-4a), 97.2 (C-6), 130.2 (C-6a), 111.1 (C-7), 148.4 (C-8), 148.4 (C-9), 112.7 (C-10), 126.0 (C-10a), 43.8 (C-10b), 28.1 (C-11), 56.8 (C-12), 63.5 (OCH₂CH₃), 15.5 (OCH₂CH₃), 55.8 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 44.2 (NCH₃) ppm [106].

Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = + 178,0 \text{ (c = 0,1; methanol).}$$

7.2. Zóna Z – 2/2*B

Látka ze zóny Z – 2/2*B byla identifikovaná jako galanthaminový alkaloid **epigalanthamin**. Výsledky *in vitro* testů na inhibiční aktivitu vůči *huAChE*, *huBChE*, POP a GSK-3 β jsou uvedeny v kapitole Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči *in vitro* testovaným enzymům.



Obrázek 28 – Epigalanthamin [32]

Molekulová hmotnost

$$M_r = 287,36$$

GC-MS spektrum

EI – MS (m/z) 278(86); 286(100) 270(16) 244(18) 230(15) 216(63) 174(20) 128(8) 115(12) [107].

^1H NMR spektrum

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.61 – 1.75 (m, 2H), 2.18 a 2.75 (dd, $J = 12, 12$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 3.07 a 3.22 (dd, $J = 12.9, 12.1$ Hz, 2H), 3.59 a 4.05 (dd, $J = 15.3, 15$ Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 4.60 (m, 2H), 5.79 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 6.55 a 6.62 (2d, $J = 8.1, 8.1$ Hz, 2H) ppm [108].

^{13}C NMR spektrum

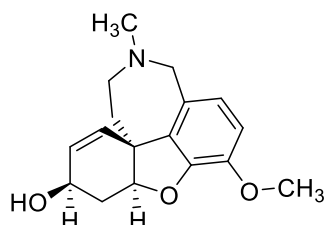
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 32.3 (2x CH_2), 34.1 (CH_3), 41.6 (CH_2), 48.0, 53.8 (CH_2), 55.8 (OCH_3), 60.1 (CH_2), 62.7 (CH), 88.4 (CH), 110.8 (CH), 121.5, 126.2 (CH), 128.9 (CH), 131.9 (CH), 132.9, 143.8, 146.6 ppm [108].

Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -229,9 \text{ (c = 0,1; chloroform).}$$

7.3. Zóna Z – 3/1*A

Testováním zóny Z – 3/1 se podařilo identifikovat neznámou substanci jako galanthaminový alkaloid **galanthamin**. Výsledky *in vitro* testů na inhibiční aktivitu vůči *huAChE*, *huBChE*, POP a GSK-3 β jsou uvedeny v kapitole **Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči *in vitro* testovaným enzymům**.



Obrázek 29 – Galanthamin [32]

Molekulová hmotnost

$$M_r = 287,36$$

GC-MS spektrum

EI – MS (*m/z*) [%] 287(80); 286(100) 270(15) 256(2) 244(28) 230(16) 216(40) 174(37) 128(9) 115(15) [107].

¹H NMR spektrum

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.65 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-8), 6.60 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-7), 6.05 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.6 Hz, H4a), 5.98 (1H, ddd, *J* = 10.4, 5.0, 1.3 Hz, H-4), 4.59 (1H, m, H-1), 4.12 (1H, m, H-3), 4.07 (1H, d, *J* = 15 Hz, H-6), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.66 (1H, dd, *J* = 15, 1.2 Hz, H-6), 3.25 (1H, ddd, *J* = 14.4, 12.8, 1.9 Hz, H-12), 3.03 (1H, ddd, *J* = 14.4, 4.0, 3.2 Hz, H-12), 2.6 – 2.8 (1H, m, H-2), 2.39 (3H, s, NCH₃), 2.07 (1H, ddd, *J* = 13.7, 12.8, 3.2 Hz, H-11), 1.99 (1H, ddd, *J* = 15.7, 5.0, 2.5 Hz, H-2), 1.56 (1H, ddd, *J* = 13.7, 4.0, 1.9 Hz, H-11) ppm [109].

¹³C NMR spektrum

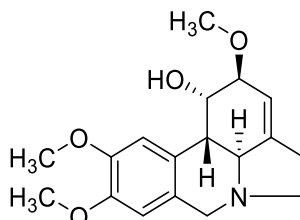
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 145.7 (C-10), 143.8 (C-9), 132.8 (C-10a), 129.2 (C-6a), 127.3 (C-4), 126.6 (C-4a), 121.7 (C7), 111.1 (C-8), 88.4 (C-1), 61.7 (C-3), 60.3 (C-6), 55.7 (OCH₃), 53.6 (C-12), 47.9 (C-10b), 41.9 (NCH₃), 33.6 (C-11), 29.8 (C-2) ppm [109].

Optická otáčivost

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

7.4. Zóna Z – 4/2*A

Na základě níže uvedených použitých chromatografických, spektrálních a optických metod se látku ze zóny Z – 4/2*A podařilo pozitivně identifikovat jako lykorinový alkaloid **galanthin**. Výsledky *in vitro* testů na inhibiční aktivitu vůči *huAChE*, *huBChE*, POP a GSK-3 β jsou uvedeny v kapitole Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči *in vitro* testovaným enzymům.



Obrázek 30 – Galanthin [32]

Molekulová hmotnost

$$M_r = 317,39$$

GC-MS spektrum

EI – MS (*m/z*) [%] 317(45); 268(16) 243(100) 242(99) 162(9) 125(13) 110(7) [110].

¹H NMR spektrum

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 4.66 (br, H-1), 3.76 (m, H-2), 5.61 (br, H-3), 2.64 (m, 2H-4), 2.35 (q, *J* = 8.7 Hz, H-5 α), 3.37 (m, H-5 β), 8.50 (d, *J* = 14 Hz, H-7 α), 4.17 (d, *J* = 14 Hz, H-7 β), 6.85 (s, H-8), 6.63 (s, H-11), 2.63 (m, H-11b), 2.74 (d, *J* = 11,6, H-11c), 3.90 (s, C-10 -OCH₃), 3.85 (s, C-9 -OCH₃), 3.52 (s, C-2 -OCH₃) ppm [111].

¹³C NMR spektrum

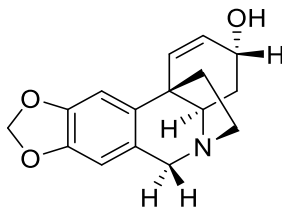
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 147.8 (C-9), 147.6 (C-10), 143.9 (C-3a), 129.3 (C-7a), 126.6 (C-11a), 115.1 (C-3), 110.8 (C8), 108.0 (C-11), 81.0 (C-2), 68.3 (C-1), 60.9 (C-11c), 57.3 (OCH₃), 56.6 (C-7), 56.0 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 53.8 (C-5), 41.5 (C-11b), 28.5 (C-4) ppm [111].

Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -56 (c = 0,01; \text{methanol}).$$

7.5. Zóna Z – 5/3*A

Screening zóny Z – 5/3*A ukázal přítomnost hlavního zástupce krininového strukturního typu alkaloidů – **krinin**. Výsledky *in vitro* testů na inhibiční aktivitu vůči *huAChE*, *huBChE*, POP a GSK-3 β jsou uvedeny v kapitole [Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči *in vitro* testovaným enzymům](#).



Obrázek 31 – Krinin ^[36]

Molekulová hmotnost

$$M_r = 271,32$$

GC-MS spektrum

EI – MS (*m/z*) 271(100); 228(21) 199(61) 187(54) 173(18) 128(18) 115(19) ^[47].

¹H NMR spektrum

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.84 (s, 1H), 6.59 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.05 – 5.59 (m, 1H), 5.90 (dd, *J* = 6, 1.2 Hz, 2H), 4.41 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 4.37 – 4.33 (m, 1H), 3.79 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 3.38 (m, 2H), 2.92 – 2.89 (m, 1H), 2.21 – 2.14 (m, 1H), 2.02 – 1.98 (m, 1H), 1.98 – 1.91 (m, 1H), 1.83 – 1.68 (m, 2H) ppm ^[112].

¹³C NMR spektrum

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ : 32.3 (s, C-4), 43.6 (t, C-11), 44.3 (s, C-10b), 53.1 (t, C-12), 61.5 (t, C-6), 62.9 (d, C-4a), 63.3 (d, C-3), 100.8 (t, OCH₂O), 102.9 (d, C-10), 106.9 (d, C-7), 125.0 (s, C-6a), 128.0 (d, C-2), 131.0 (d, C-1), 137.8 (s, C-10a), 145.8 (s, C-8), 146.3 (s, C-9) ppm ^[113].

Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -70 \text{ (} c = 0,05; \text{ chloroform)}.$$

8. Výsledky stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči *in vitro* testovaným enzymům

V níže uvedené tabulce jsou výsledky stanovení inhibičních aktivit jednotlivých izolovaných alkaloidů vůči enzymům *huAChE*, *huBChE*, GSK-3 β a POP. Metodiku testování nalezneme v podkapitolách Materiál a přístroje použité při stanovení biologické aktivity a Metody použité při stanovení biologické aktivity. Výsledky měření byly porovnány s odbornou literaturou [36]. Alkaloid epigalanthamin nebyl izolován v množství dovolujícím vykonat *in vitro* inhibiční testy. Pro nízkou procentuální inhibici alkaloidů vůči GSK-3 β , se jejich hodnota IC₅₀ nestanovovala.

Tabulka 16 – Výsledky měření IC₅₀ izolovaných alkaloidů v porovnání vůči standardům

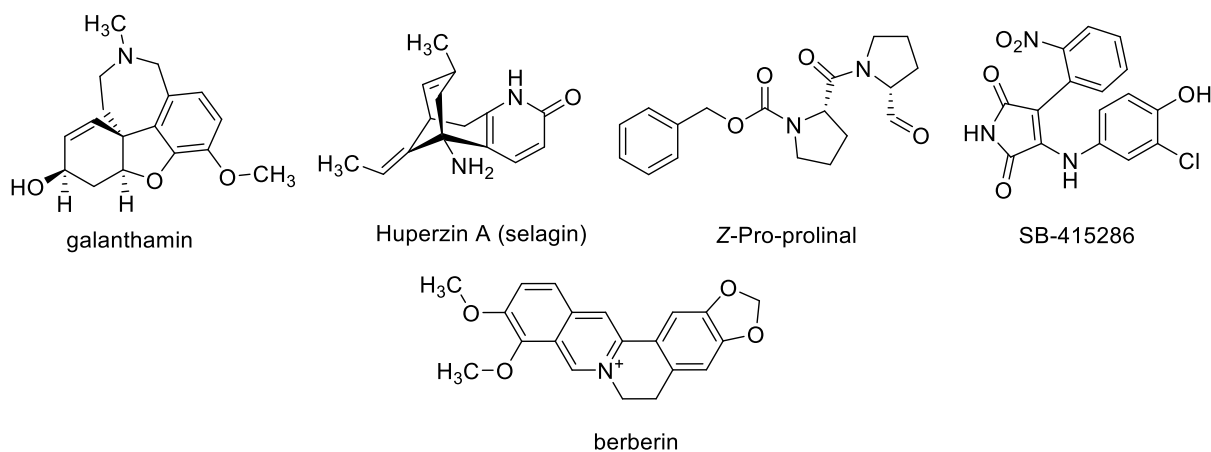
LÁTKA	IC ₅₀ <i>huAChE</i> [μ M]	IC ₅₀ <i>huBChE</i> [μ M]	IC ₅₀ POP [μ M]	INHIBICE GSK-3 β [%]	IC ₅₀ GSK-3 β [μ M]
O-ETHYLLYKORENIN ¹	> 500	> 500	> 500	58 \pm 30	n.d.
EPIGALANTHAMIN ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GALANTHAMIN ¹	1,70 \pm 0,10	42,30 \pm 1,30	> 500	n.d.	n.d.
GALANTHIN ¹	600 \pm 60	> 500	> 500	26 \pm 70	n.d.
KRININ ¹	> 500	> 500	> 500	40 \pm 50	n.d.
GALANTHAMIN ²	1,70 \pm 0,10	42,30 \pm 1,30	> 500	n.d.	n.d.
HUPERZIN A ²	0,033 \pm 0,001	> 500	n.d.	n.d.	n.d.
Z-PRO-PROLINAL ³	n.d.	n.d.	0,00275	n.d.	n.d.
BERBERIN ³	n.d.	n.d.	142 \pm 21	n.d.	n.d.
SB – 415286 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,070

¹ – látky získané izolací extraktu č. 82 – 94

² – standardy pro stanovení inhibiční aktivity vůči *huAChE* a *huBChE*

³ – standardy pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP

⁴ – standard pro stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β



Obrázek 32 – Přehled struktur jednotlivých standardů [32][92][114][115]

9. Diskuse a závěr

Již po mnoho let jsou druhy čeledi Amaryllidaceae předmětem nejrůznějších studií, které se soustředí hlavně na pochopení a objasnění jejich biologické aktivity. Jedním z hlavních důvodů pro realizaci těchto studií je bezpochyby přítomnost značného množství farmakologicky aktivních, bazických sekundárních metabolitů, které souhrnně označujeme jako amaryllkovité alkaloidy. Tyto substance vykazují nejrůznější biologickou aktivitu, a to zejména antibakteriální, antivirovou, antiparazitární a antimalarickou. Některé substance také vykazují antineoplastickou aktivitu proti nejrůznějším liniím nádorových buněk a některé zas působí inhibičně na různé druhy lidských enzymatických systémů. Tyto jejich vlastnosti se dnes využívají například v terapii AD, k léčbě nejrůznějších typů neoplazmat nebo jako prostředky lidové medicíny.

Mimo rešeršních prací tkví podstata této diplomové práce v části experimentální, jejíž hlavní náplní byla izolace, separace a následná purifikace alkaloidní podfrakce č. 82 – 94, získané paní PharmDr. Danielou Hulcovou, Ph.D., pomocí sloupcové chromatografie z hrubého extraktu cibulí druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Dutch Master' [36]. Z této podfrakce se podařilo izolovat celkově pět látek alkaloidní povahy, z čehož čtyři byly v množství dostatečném pro vykonání jak strukturní, tak biologické analýzy a jedna v množství vystačujícím pouze pro vykonání strukturní analýzy. Strukturní analýza zahrnovala jak metody chromatografické – GC-MS, tak spektrální – ^1H a ^{13}C NMR a také metody optické – polarimetrie. Na základě výsledků těchto metod a jejich porovnání s odbornou literaturou, se podařilo identifikovat všech pět neznámých alkaloidů, a to jako *O*-etyllykorenin, epigalanthamin, galanthamin, galantin a krinin. Po objasnění jejich struktury, byly všechny tyto alkaloidy podrobeny *in vitro* testům na inhibiční aktivitu vůči enzymům *huAChE*, *huBChE*, POP a GSK-3 β . Po porovnání výsledků *in vitro* testů ze standardy, jediný galanthamin vykazoval dobrou inhibiční aktivitu vůči *huAChE* (IC_{50} 1,70 \pm 0,10 μM) a *huBChE* (IC_{50} 42,30 \pm 1,30 μM).

Galanthamin, dnes jediný terapeutický využívaný amaryllkovitý alkaloid, byl prvně izolovaný v roce 1940 z cibulí druhu *Galanthus nivalis* L. – Sněžěnka podsněžník (Amaryllidaceae) [32]. Nalézt ho můžeme také v některých dalších rodech čeledi Amaryllidaceae, a to například v rodu *Leucojum* L. (například *Leucojum aestivum* L.) nebo rozličných kultivarech druhů rodu *Narcissus* L. (například *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. 'Early Glory', cv. 'Dutch Master', cv. 'Magnificience', cv. 'Rembrant' a mnoho dalších – Tabulka 14) [32][36][116]. V minulosti se galanthamin využíval jako antidotum k odvrácení paralýzy svalů vyvolané tubokurarinem. V bývalém SSSR se také využíval v anesteziologii, jako agens k ukončení účinků nedepolarizujících myorelaxancií (mělo se za to, že galanthamin nevyvolává tak rozsáhlou aktivaci muskarinových receptorů jako neostigmin, a tím pádem nebyla potřeba odvrátit jejich nadměrnou aktivaci pomocí atropinu) [116]. Dnes terapeutické použití galanthaminu tkví v jeho

schopnosti revezibilně inhibovat lidské ChE a modulovat pre- a postsynaptické homomerní $\alpha 7$ a heteromerní $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ nAChRs, čehož výsledkem je posílení synaptického přenosu, a navíc se předpokládá, že modulace nAChRs má protektivní účinek vůči $A\beta$ indukované apoptóze nervových buněk. Další jeho výhodnou vlastností je jeho dobrá propustnost přes hematoencefalickou bariéru, což z něj společně s předchozími vlastnostmi udělalo agens, který se dodnes využívá v terapii AD ^{[27][46]}.

10. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Ústav: Katedra farmakognozie (16-16180)

Řešitel: Štefan Kosturko

Školitel: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Název práce: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita II.

Klíčová slova: *Narcissus pseudonarcissus* dutch master; cibule; alkaloidní extrakty; GC/MS analýza; biologická aktivita; acetylcholinesterasa; butyrylcholinesterasa.

Hlavní náplní diplomové práce „Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita II.“ byla izolace alkaloidů jako čistých substancí, v množství dostatečném k identifikaci jejich struktury a *in vitro* testům biologické aktivity. Alkaloidy byly separovány z podfrakce číslo 82 – 97 o hmotnosti 2,3268 g, která byla jako součást celkového rostlinného extraktu připravena paní doktorkou PharmDr. Danielou Hulcovou Ph.D., v rámci její doktorské disertační práce. Doktorka Hulcová vykonala primární extrakční a separační práce a získala celkový koncentrovaný alkaloidní extrakt o hmotnosti 58 g, který zahrnoval již zmíněnou podfrakci.

Již zmíněná alkaloidní podfrakce byla prostřednictvím preparativní chromatografie na tenké vrstvě rozdělena na pět samostatných separátů, které byly podrobeny dalším fytochemickým pracím a bylo získáno pět alkaloidů v čistém stavu. Získané alkaloidy byly podrobeny strukturní analýze pomocí GC-MS, NMR a byla u nich stanovena optická otáčivost. Na základě těchto dat byly stanoveny jako *O*-ethyllykorenin, epigalanthamin, galanthamin, galantin a krinin.

Všechny, výše uvedené substance byly podrobeny *in vitro* testům na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám – acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa, prolyl oligopeptidase a glykogensynthase kinase 3 β . Výsledky *in vitro* testování byly porovnány s odborní literaturou a v porovnání se standardy, kromě galanthaminu (IC_{50} huAChE 1,70 \pm 0,10 μ M; IC_{50} huBChE 42,30 \pm 1,30 μ M), vykazují všechny zbylé alkaloidy velice nízkou inhibiční schopnost vůči všem stanovovaným enzymům.

11. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmacognosy (16-16180)

Author: Štefan Kosturko

Supervisor: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Advisor: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Thesis title: Alkaloids of the family Amaryllidaceae and their biological activity II.

Key words: *Narcissus pseudonarcissus* dutch master; bulbs; alkaloidal extracts; GC/MS analysis; biological activity; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase.

The main aim of the thesis „Alkaloids of the family Amaryllidaceae and their biological activity II.“ was the isolation of alkaloids, as a pure substances, in sufficient quantities to identify their structure and to test their biological activity *in vitro*. Alkaloids were separated from subfraction number 82 – 97 of weigh 2,3268 g. This subfraction was a part of the total plant extract, which was prepared by PharmDr. Daniela Hulcová Ph.D., as a part of her dissertation thesis and who also performed primary extraction and separation work. A total and concentrated alkaloid extract weighing 58 g, which included the aforementioned subfraction, was obtained.

The already mentioned alkaloid subfraction, was divided by preparative thin-layer chromatography into five separates, which were subjected to further phytochemical work, and five pure alkaloids were obtained. These alkaloids were subjected to structural analysis by GC-MS, NMR and optical rotatory was also determined. Based on these data, alkaloids were identified as *O*-ethyllycorenine, epigalanthamine, galanthamine, galanthine and crinine.

Each substances was subjected to *in vitro* testing of inhibitory activity against human cholinesterases – acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase and glycogensynthase kinase 3 β . Compared to the standards and literature, all of the obtained alkaloid substances, except galanthamine (IC_{50} *huAChE* $1,70 \pm 0,10$ μ M; IC_{50} *huBChE* $42,30 \pm 1,30$ μ M), show weak inhibitory potential against all of the enzymes which were tested.

12. Seznam použité literatury

- [1] Spilková, J., Martin, J., Siatka, T., Tůmová, L., & Kašparová, M. (2016). Alkaloidy. V *Farmakognozie* (stránky 193-255). Praha: Nakladatelství Karolinum.
- [2] Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. (2015). Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. V P. Gopalakrishnakone, C. Carlini, & R. Ligabue-Braun, *Plant Toxins*. Dordrecht: Springer. doi:doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_2-1
- [3] Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., Brůčková, L., & Cahlíková, L. (15. Zář 2013). Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 107(9), stránky 701-708. Načteno z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/614/614>
- [4] Zhenghao, Xu; Le, Chang. (2017). Amaryllidaceae. V *Identification and Control of Common Weeds: Volume 3* (stránky 877-889). Singapore: Springer. doi:doi.org/10.1007/978-981-10-5403-7
- [5] Desgagné-Penix, I. (14. Květen 2020). Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews*. doi:doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5
- [6] Koutová, D., Maafi, N., Havelek, R., Opletal, L., Blunden, G., Řezáčková, M., & Cahlíková, L. (16. Květen 2020). Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. *Molecules*, 25(10). doi:doi.org/10.3390/molecules25102337
- [7] Dugas, D. (2007). *500 najlpších receptov ľudovej medicíny*. Žilina: Knižné centrum, vydavateľstvo.
- [8] Opletal, L., & Koula, V. (nedatováno). *Daidalea*, 1.0. Získáno 6. Srpen 2019, z Amaryllidaceae JAUME ST.-Hil. - amarylkovitě: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>
- [9] Grulich, V. (21. Leden 2020). *Botany*. Získáno 29. Květen 2020, z Amaryllidaceae J. St.-Hil. - amarylkovitě: <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/>
- [10] Pickles, S. (1990). *The Language of flowers*. New York: Harmony Books.
- [11] Hanks, R. G. (2002). The biology of Narcissus. V *Narcissus and Daffodil* (stránky 1-18). London: Taylor & Francis.
- [12] Carapeto, A. (2018). *Narcissus willkommii*. Získáno 31. Květen 2020, z The IUCN Red List of Threatened Species 2018: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T68187345A68187355.en>
- [13] Rankou, H. (2018). *Narcissus jacquemoudii*. Získáno 31. Květen 2020, z The IUCN Red List of Threatened Species: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T53790455A53798214.en>
- [14] Graham, S. W., & Barrett, S. C. (1. Červenec 2004). Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphism in Narcissus (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*, 91(7), stránky 1007-1021. doi:doi.org/10.3732/ajb.91.7.1007
- [15] Štěpánková, J. (2011). *Květena České republiky 8*. Praha: Academia.

- [16] Kaplan, Z. (2019). *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia.
- [17] Fernandes, A. (1968). *Keys to the identification of native and naturalized taxa of the genus Narcissus L. Daffodil and Tulip Year Book*. London: The Royal Horticultural Society
- [18] Mathew, B. (2002). Classification of genus *Narcissus*. V B. Mathew, *Narcissus and Daffodil* (stránky 30-54). London: Taylor & Francis.
- [19] *Royal Horticultural Society*. (Prosinec 2017). Získáno 17. Červen 2020, z <https://www.rhs.org.uk/plants/pdfs/plant-registration-forms/daffbotanical.pdf>
- [20] *Royal Horticultural Society*. (2012). Získáno 17. Červen 2020, z <https://www.rhs.org.uk/plants/pdfs/plant-registration-forms/daffhortclass.pdf>
- [21] *The American Daffodil Society*. (nedatováno). Získáno 17. Červen 2020, z <https://daffodilusa.org/daffodil-info/daffodil-divisions-cultivars/>
- [22] *Dutch Master*. (2004). Získáno 25. Listopad 2019, z Dafseek - Daffodil Database with Photos: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Dutch%2520Master#>
- [23] *Royal Horticultural Society*. (2014). Získáno 25. Listopad 2019, z <https://www.rhs.org.uk/plants/pdfs/Plant-Society-competition-schedules/Daffodil,-Hyacinth-and-Tulip/4-rhs-schedule-2014-classification.pdf>
- [24] *Narcissus pseudonarcissus* L. (nedatováno). Získáno 16. Červen 2020, z Itis Report: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503930#null
- [25] *Narcissus pseudonarcissus*. (nedatováno). Získáno 16. Červen 2020, z EUROPLUSMED PlantBase: https://europusmed.org/cdm_dataportal/taxon/bd7951b3-e7b0-465b-8047-d4726474a875
- [26] Reis, A., Magne, K., Massot, S., Tallini, L. R., Scopel, M., Bastida, J., . . . Zuanazzi, J. A. (11. Červen 2019). Amaryllidaceae alkaloids: indentification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Scientific Reports*, 9. doi:doi.org/10.1038/s41598-019-44746-7
- [27] Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N. B., de Andreade, J. P., Martínéz, V., . . . Viladomat, F. (17. Leden 2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. V *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (stránky 66-100). Kerala: Transworld Research Network.
- [28] Nair, J. J., & Staden, v. (Leden 2019). Antiplasmodial constituents in the minor alkaloid groups of the Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany*(126), stránky 362-370. doi:doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.012
- [29] Abdullah, M. A., Maříková, J., Hulcová, D., Janoušek, J., Šafrátová, M., Nováková, L., . . . Cahlíková, L. (22. Květen 2020). Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules*, 10(5). doi:doi.org/10.3390/biom10050800
- [30] Sibanyoni, M. N., Chaudhary, S. K., Chen, W., Adhami, H.-R., Combrick, S., Maharaj, V., . . . Viljoen, A. (Říjen 2020). Isolation, in vitro evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae. *Fitoterapia*, 146. doi:doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104650

- [31] Park, J. B. (Prosinec 2014). Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(23), stránky 5381-5384. doi:doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.051
- [32] Bastida, J., & Viladomat, F. (2002). Alkaloids od Narcissus. V *Narcissus and Daffodil* (stránky 141-214). London: Taylor & Francis.
- [33] López, S., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (11. Říjen 2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Science*, 71(21), stránky 2521-2529. doi:doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9
- [34] Karakoyun, Ç., Bozkurt, B., Çoban, G., Masi, M., Cimmino, A., Unver, N., & Domer, N. U. (Květen 2020). A comprehensive study on narcissus tazetta subsp. tazetta L.: Chemo-profiling, isolation, anticholinesterase activity and molecular docking of amaryllidaceae alkaloids. *South African Journal of Botany*, 130, stránky 148-154. doi:doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.016
- [35] Houghton, P., Agbedahunsi, J., & Adegbulugbe, A. (Listopad 2004). Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian Crinum species. *Phytochemistry*, 65(21), stránky 2893-2896. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.052
- [36] Hulcová, D., Maříková, J., Korábečný, J., Hošťálková, A., Jun, D., Kuneš, J., . . . Cahlíková, L. (Září 2019). Amaryllidaceae alkaloids from Narcissus pseudonarcissus L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 165. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055
- [37] Lin, L.-Z., Hu, S.-F., Chai, H.-B., Pengsuparp, T., Pezzuto, J., Cordell, G., & Ruangrunsi, N. (Duben 1995). Lycorine alkaloids from Hymenocallis littoralis. *Phytochemistry*, 40(4), stránky 1295-1298. doi:doi.org/10.1016/0031-9422(95)00372-E
- [38] Havelek, R., Muthna, D., Tomsik, P., Kralovec, K., Seifrtova, M., Cahlikova, L., . . . Rezacova, M. (Září. 25 2017). Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions*, stránky 121-132. doi:doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.018
- [39] Li, L., Zhang, Z., Yang, Q., & Ning, M. (15. Srpen 2019). Lycorine inhibited the cell growth of non-small cell lung cancer by modulating the miR-186/CDK1 axis. *Life Science*, 231. doi:doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.003
- [40] Liu, D.-D., Guo, Y.-F., Zhang, J.-Q., Yang, Z.-K., Li, X., Yang, B., & Yang, R. (15. Únor 2017). Inclusion of lycorine with natural cyclodextrins (α -, β - and γ -CD): Experimental and in vitro evaluation. *Journal of Molecular Structure*, 1130, stránky 669-676. doi:doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.11.018
- [41] Chen, H., Lao, Z., Xu, J., Li, Z., Long, H., Li, D., . . . Wu, J. (Červenec 2020). Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology*, 546, stránky 88-97. doi:doi.org/10.1016/j.virol.2020.04.009
- [42] Çitoğlu, G., Acıkara, Ö., Yılmaz, B., & Özbek, H. (Leden 2012). Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from Sternbergia fisheriana (Herbert) Rupr. *Fitoterapia*, 83(1), stránky 81-87. doi:doi.org/10.1016/j.fitote.2011.09.008

- [43] Takos, A. M., & Rook, F. (31. Květen 2013). Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journals of Molecular Science*, 14(6), stránky 11713-11741. doi:doi.org/10.3390/ijms140611713
- [44] Emir, C., Emir, A., Bozkurt, B., & Somer, N. (Březen 2019). Phytochemical constituents from *Galanthus alpinus* Sosn. var. *alpinus* and their anticholinesterase activities. *South African Journal of Botany*, 121, stránky 63-67. doi:doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.021
- [45] Ka, S., Masi, M., Merindol, N., Lecce, R., Plourde, M., Seck, M., . . . Evidente, A. (Červenec 2020). Gigantelline, gigantellinine and gigantocrinine, cherylline- and crinine-type alkaloids isolated from *Crinum jagus* with anti-acetylcholinesterase activity. *Phytochemistry*, 175. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112390
- [46] Moraga-Nicolás, F., Iturriaga-Vásquez, P., Mutis, A., Hormazábal, E., & Bermúdez-Díaz, I. (Červenec-Srpen 2019). Galanthamine and other Amaryllidaceae related alkaloids are inhibitors of $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(4), stránky 495-499. doi:doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.003
- [47] Berkov, S., Romani, S., Herrera, M., Viladomat, F., Codina, C., Momekov, G., . . . Bastida, J. (25. Březen 2011). Antiproliferative Alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*, 25(11), stránky 1686-1692. doi:doi.org/10.1002/ptr.3468
- [48] Kilgore, M., & Kutchan, T. (16. Červen 2016). The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry Reviews*, 15(3), stránky 317-337. doi:doi.org/10.1007/s11101-015-9451-z
- [49] Angle, S., & Wada, T. (17. Listopad 1997). An Approach to the Narciclasine Alkaloids via a Quinone Methide Initiated Cyclization Reaction. *Tetrahedron Letters*, 38(46), stránky 7955-7958. doi:doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10138-1
- [50] Nair, J., Aremu, A., & Staden, J. (Říjen 2011). Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), stránky 1102-1106. doi:doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.028
- [51] Shen, C.-Y., Xu, X.-L., Yang, L.-J., & Jiang, J.-G. (Březen 2019). Identification of narciclasine from *Lycoris radiata* (L'Her.) Herb. and its inhibitory effect on LPS-induced inflammatory responses in macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 125, stránky 605-613. doi:doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.003
- [52] Bräutigam, J., Bischoff, I., Schürmann, C., Buchmann, G., Epah, J., Fuchs, S., . . . Fürst, R. (Říjen 2019). Narciclasine inhibits angiogenic processes by activation of Rho kinase and by downregulation of the VEGF receptor 2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 135, stránky 97-108. doi:doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.08.001

- [53] Moraga-Nicolás, F., Jara, C., Godoy, R., Iturriaga-Vasquez, P., Venthur, H., Quiroz, A., . . . Hormazábal, E. (Leden-Únor 2018). Rhodolirium andicola: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), stránky 34-43. doi:doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.009
- [54] Pagliosa, L., Monteiro, S., Silva, K., Andrade, J., Dutilh, J., Bastida, J., . . . Zuanazzi, J. (Červenec 2010). Effect of isoquinoline alkaloids from two Hippeastrum species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, 17(8-9), stránky 698-701. doi:doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.003
- [55] Masi, M., Frolova, L., Yu, X., Mathieu, V., Cimmino, A., Carvalho, A., . . . Evidente, A. (Duben 2015). Jonquiline, a new pretazettine-type alkaloid isolated from Narcissus jonquilla quail, with activity against drug-resistant cancer. *Fitoterapia*, 102, stránky 41-48. doi:doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.009
- [56] Şener, B., Orhan, I., & Satayavivad, J. (05. Prosinec 2003). Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*, 17(10), stránky 1220-1223. doi:doi.org/10.1002/ptr.1346
- [57] Silva, A. F., Andrade, J. P., Machado, K. R., Rocha, A. B., Apel, M. A., Sobral, M. E., . . . Zuanazzi, J. A. (17. Říjen 2008). Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of Hippeastrum vittatum. *Phytomedicine*, 15(10), stránky 882-885. doi:doi.org/10.1016/j.phymed.2007.12.001
- [58] Masi, M., Slambrouck, V. S., Gunawardana, S., Rensburg, M., James, P., Mochel, J., . . . Evidente, A. (Listopad 2019). Alkaloids isolated from Haemanthus humillis Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity od coccinine and montanine. *South Africa Journal of Botany*, 126, stránky 277-281. doi:doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.036
- [59] Shammari, L., Mamun, A., Koutová, D., Majorošová, M., Hulcová, D., Šafratová, M., . . . Cahlíková, L. (Listopad 2019). Alkaloid Profiling of Hippeastrum Cultivars by GC-MS, Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids and Evaluation of Their Cytotoxicity. *Records of Natural Products*, 14(2), stránky 154-159. doi:10.25135/rnp.147.19.06.1302
- [60] Labraña, J., Machocho, A. K., Kricsfalusy, V., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J. (Srpen 2002). Alkaloids from Narcissus angustifolius subsp. transcarpaticus (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*(8), stránky 847-852. doi:doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00154-1
- [61] Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (19. Červenec 2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Interantional Joournal of Nanomedicine*, 14, stránky 5541-5554. doi:doi.org/10.2147/IJN.S200490
- [62] Zahradová, L. (2016). Systémová amyloidóza. *Onkologgia*, 11(6), stránky 361-364. Načteno z http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=8231&magazine_id=10
- [63] Rohan, Z., Matěj, R., & Rusina, R. (29. Září 2015). Překrývání neurodegenerativních demencí. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*(6), str. 29. doi:doi: 10.14735/amcsnn2015641
- [64] Park, S.-Y. (30. Říjen 2010). Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Archives of Pharmacal Research*, 33, stránky 1589-1609. doi:doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y

- [65] Šerý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (28. Březen 2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica*, 51(1), stránky 1-9. doi:doi.org/10.5114/fn.2013.34190
- [66] Giebeler, N., & Zigrino, P. (23. Duben 2016). A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins*, 8(4). doi:doi.org/10.3390/toxins8040122
- [67] Parson, C., Stöffler, A., & Danysz, W. (Listopad 2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, 53(6), stránky 699-723. doi:doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013
- [68] Lane, C., & Schott, J. (4. Zář 2017). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), stránky 59-70. doi:doi.org/10.1111/ene.13439
- [69] Barbier, P., Zejneli, O., Martinho, M., Lasorsa, A., Belle, V., Smet-Nocca, C., . . . Landrieu, I. (07. Srpen 2019). Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. doi:doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204
- [70] Thomson, P. (nedatováno). *Stratech*. Získáno 06. Červenec 2020, z Tau Aggregation and Alzheimer's: <https://www.stratech.co.uk/news/tau-aggregation-and-alzheimers/>
- [71] Jiráček, R. (2009). Terapie Alzheimerov choroby a příbuzných neurodegenerativních demenci. *Neurologie pro praxi*, 10(6), stránky 384-389. Načteno z https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200906-0013_Terapie_Alzheimerovy_choroby_a_pribuznych_neurodegenerativnich_demenci.php
- [72] Herrmann, N. (1. Ř 2002). Cognitive Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease and other Dementias. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 47(8), stránky 715-722. doi:doi.org/10.1177/070674370204700802
- [73] Doležal, M., Opletalová, V., Miletín, M., Zimčík, P., & Kučerová, M. (2016). *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Karolinum.
- [74] Gerzon, K., Krumkalns, E., Brindle, R., Marshall, F., & Root, M. (1. Listopad 1963). The Adamantyl Group in Medicinal Agents. I. Hypoglycemic N-Arylsulfonyl-N'-adamantylureas. *Journal of Medicinal Chemistry*, 6(6), stránky 760-763. doi:doi.org/10.1021/jm00342a029
- [75] Holmerová, I., Janečková, H., Vaňková, H., & Veleta, P. (2005). Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy demence a praktické aspekty péče o postižené. *Psychiatrie pro praxi*, 4, stránky 180-184. Načteno z <https://www.psychiatriepropraxi.cz>
- [76] Chauhan, N. (6. Prosinec 2006). Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *Journal of Ethnopharmacology*, 180(3), stránky 385-394. doi:doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.030
- [77] *Databáze léků*. (1. Červenec 2020). Získáno 7. Červenec 2020, z SÚKL: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php/ginkgo>
- [78] *Léčivé byliny, kapsle, masti, extrakty a semena*. (nedatováno). Získáno 10. Červenec 2020, z Salvia Paradise: <https://www.salviaparadise.cz/>

- [79] Marumoto, S., & Miyazawa, M. (29. Prosinec 2009). β -secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytotherapy Research*, 24(4), stránky 510-513. doi:doi.org/10.1002/ptr.2967
- [80] Jung, H., Min, B.-S., Yokozawa, T., Lee, J.-H., Kim, Y., & Choi, J. (Srpen 2009). Anti-Alzheimer and Antioxidant Activities of *Coptidis Rhizoma* Alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(8), stránky 1433-1438. doi:doi.org/10.1248/bpb.32.1433
- [81] Jeon, S.-Y., Kwon, S.-Y., Seong, Y.-H., Bae, K., Hur, J.-M., Lee, Y.-Y., . . . Song, K.-S. (27. Červen 2007). β -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax Rhizoma*. *Phytomedicine*, 14(6), stránky 403-408. doi:doi.org/10.1016/j.phymed.2006.09.003
- [82] Wang, X., Kim, J.-R., Lee, S.-B., Kim, Y.-J., Jung, M., Kwon, H.-W., & Ahn, Y.-J. (05. Březen 2014). Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 18(88). doi:doi.org/10.1186/1472-6882-14-88
- [83] Bidon-Chanal, A., Fuertes, A., Alonso, D., Pérez, D., Martínez, A., Luque, F., & Medina, M. (Únor 2013). Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, stránky 479-489. doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.014
- [84] Meijer, L., Thunnissen, A.-M., White, A., Garnier, M., Nikolic, M., Tsai, L.-H., . . . Pettit, G. (1. Leden 2000). Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chemistry & Biology*, 7(1), stránky 51-63. doi:doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00063-6
- [85] Hamann, M., Alonso, D., Martín-Aparicio, E., Fuertes, A., Pérez-Puerto, M. J., Castro, A., . . . Martínez, A. (21. Srpen 2007). Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitory Activity and Structure–Activity Relationship (SAR) Studies of the Manzamine Alkaloids. Potential for Alzheimer's Disease. *Journal of Natural Products*, 70(9), stránky 1397-1405. doi:doi.org/10.1021/np060092r
- [86] Leclers, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bill, J., Snyder, G., . . . Meijer, L. (5. Leden 2001). Indirubins Inhibit Glycogen Synthase kinase-3 Beta and CDK5/p25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. A Property Common to Most Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors? *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), stránky 251-260. doi:doi.org/10.1074/jbc.M002466200
- [87] Wang, W., Wu, Y., Xu, H., Shang, Y., Chen, Y., Yan, M., . . . Walt, D. (Prosinec 2019). Accumulation mechanism of indigo and indirubin in *Polygonum tinctorium* revealed by metabolite and transcriptome analysis. *Industrial Crops and Products*, 141. doi:doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111783
- [88] *DANG-GUI-LONG-HUI-WAN / SELECT OPTION: Concentrated Granules or Whole Herbs*. (10. Červenec 2020). Načteno z Shen Clinic: <https://shenclinic.com/products/dang-gui-long-hui>
- [89] Cahlíková, L., Hulová, L., Hrabínová, M., Chlebek, J., Hošťálková, A., Adamcová, M., . . . Macáková, K. (Červenec 2015). Fitoterapia. *Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors*, 103, stránky 192-196. doi:doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.004

- [90] Han, A.-R., & Paik, Y.-S. (30. Zář 2013). Antioxidant and Prolyl Endopeptidase Inhibitory Capacities of Chromone C-glucosides from the Clove Buds (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Applied Biological Chemistry*, 55(3), stránky 195-198. doi:doi.org/10.3839/jabc.2012.031
- [91] Filho, A., Morel, A., Adolpho, L., Ilha, V., Giralt, E., Tarragó, T., & Dalcol, I. (25. Leden 2012). Inhibitory Effect of Verbascoside Isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on Prolyl Oligopeptidase Activity. *Phytotherapy Research*, 26, stránky 1472-1475. doi:doi.org/10.1002/ptr.4597
- [92] Tarrago, T., Kichik, N., Seguí, J., & Giralt, E. (1. Březen 2007). The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. *ChemMedChem*, 2, stránky 354-359. doi:doi.org/10.1002/cmdc.200600303
- [93] Tarragó, T., Kichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixidó, M., & Giralt, E. (1. Srpen 2008). Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), stránky 7516-7524. doi:doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.067
- [94] Zhiming, F., Hang, W., Xiaofei, H., Zhaolin, S., & Chunchao, H. (Červenec 2013). The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), stránky 122-127. doi:doi.org/10.7324/JAPS.2013.3723
- [95] Ahmed, E., Nawar, S. A., Malik, A., & Choudhary, M. (1. Únor 2006). Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(3), stránky 573-580. doi:doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.042
- [96] Hošťálková, A., Opletal, L., Kuneš, J., Novák, Z., Hrabínová, M., Chlebek, J., . . . Cahlíková, L. (1. Duben 2015). Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. *Natural Product Communications*, 10(4), stránky 577-580. doi:doi.org/10.1177/1934578X1501000410
- [97] Získáno 11. Červenec 2020, z Swanson: <https://www.swanson.cz/>
- [98] Munier, R. (1953). Separation of Alkaloids From Their N-oxides by Paper Chromatography. *Bulletin de la Societe de chimie biologique*, 35(10), stránky 1225-1231.
- [99] Dušek, J., Kašparová, M., Siatka, T., Spilková, J., & Tůmová, L. (2014). *Praktická cvičení z farmakognosie*. Praha: Karolinum.
- [100] *Československý lékopis; 3. vydání - 1. díl.* (1971). Praha: Avicenum.
- [101] Klimeš, J., Sochor, J., Mokrý, M., Kastner, P., & Pilářová, P. (2015). *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Jiří Klimeš, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy.
- [102] Karasová Žďárová, J., Kuča, K., Jun, D., & Bajgar, J. (15. Únor 2010). Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické Listy*, 104(1), stránky 46-50. Načteno z http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_46-50.pdf
- [103] Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G., & Keserü, G. (Únor 2007). A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 5(1), stránky 75-84. doi:doi.org/10.1089/adt.2006.029

- [104] Promega Corporation. (Únor 2015). *Kinase-Glo[®] Luminescent Kinase Assays*. Získáno 17. Listopad 2019, z Promega: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/kinase-glo-luminescent-kinase-assay-platform-protocol.pdf?la=en>
- [105] Kreh, M., Matusch, R., & Witte, L. (Únor 1995). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, *38*(3), stránky 773-776. doi:doi.org/10.1016/0031-9422(94)00725-9
- [106] Huang, S.-D., Zhang, Y., He, H.-P., Li, S.-F., Tang, G.-H., Chen, D.-Z., . . . Hao, X.-J. (4. Červenec 2013). A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *11*(4), stránky 406-410. doi:doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60060-6
- [107] Berkov, S., Bastilda, J., Viladomat, F., & Codina, C. (16. Červen 2008). Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. *Phytochemical Analysis*, *19*(4), stránky 285-293. doi:doi.org/10.1002/pca.1028
- [108] Trinadchachari, G. N., Kamat, A. G., Babu, K. R., Sanasi, P. D., & Prabahar, K. J. (31. Leden 2014). Stereoselective syntheses of galanthamine and its stereoisomers by complementary Luche and L-selectride reductions. *Tetrahedron: Asymmetry*, *25*(2), stránky 117-124. doi:doi.org/10.1016/j.tetasy.2013.11.016
- [109] Node, M., Kodama, S., Hamashima, Y., Katou, T., Nishide, K., & Kajimoto, T. (21. Zář 2006). Biomimetic Synthesis of (+/-)-Galanthamine and Asymmetric Synthesis of (-)-Galanthamine Using Remote Asymmetric Induction. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *54*(12), stránky 1662-1679. doi:doi.org/10.1248/cpb.54.1662
- [110] Pigni, N. B., Ríos-Ruiz, S., Martínez-Francés, V., Nair, J. J., Viladomat, F., Codina, C., & Bastida, J. (23. Srpen 2012). Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *Journal of Natural Products*, *82*(10), stránky 1643-1647. doi:doi.org/10.1021/np3003595
- [111] Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Rubiralta, M., Quirion, J.-C., Husson, H.-P., & Ma, G.-E. (1. Listopad 1990). Narcissus Alkaloids, XIII. Complete Assignment of the Nmr Spectra of Papyramine and 6-epi-Papyramine by Two-Dimensional Nmr Spectroscopy. *Journal of Natural Products*, *53*(6), stránky 1456-1462. doi:doi.org/10.1021/np50072a009
- [112] Verma, P., Chandra, A., & Pandey, G. (13. Červenec 2018). Diversity-Oriented Approach Toward the Syntheses of Amaryllidaceae Alkaloids via a Common Chiral Synthon. *The Journal of Organic Chemistry*, *83*(17), stránky 9968-9977. doi:doi.org/10.1021/acs.joc.8b01368
- [113] Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J., Mathee, S., & Campbell, W. (Říjen 1995). Further alkaloids from *Brunsvigia Josephinae*. *Phytochemistry*, *40*(3), stránky 961-965. doi:doi.org/10.1016/0031-9422(95)00375-H
- [114] SB415286. (nedatováno). Získáno 6. Srpen 2020, z Selleckchem: <https://www.selleckchem.com/products/sb-415286.html>
- [115] Z-Pro-Prolinal. (13. Červen 2005). Získáno 6. Srpen 2020, z Drugbank: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB03535>
- [116] Harvey, A. L. (1995). The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacology & Therapeutics*, *68*(1), stránky 113-128. doi:doi.org/10.1016/0163-7258(95)02002-0

13. Seznam obrázků, tabulek a rovnic

Obrázek 1 – Biosyntéza hlavního prekursoru amarylkovitých alkaloidů	18
Obrázek 2 – Biosyntéza hlavních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů	19
Obrázek 3 – Belladinový strukturní typ a jeho zástupci.....	20
Obrázek 4 – Lykorinový strukturní typ a jeho zástupci.....	22
Obrázek 5 – Homolykorinový strukturní typ a jeho zástupci.....	25
Obrázek 6 – Galanthaminový strukturní typ a jeho zástupci.....	26
Obrázek 7 – Haemanthaminový a krininový strukturní typ a jejich zástupci	28
Obrázek 8 – Narciklasinový strukturní typ a jeho zástupci	31
Obrázek 9 – Tazettinový strukturní typ a jeho zástupci.....	32
Obrázek 10 – Montaninový strukturní typ a jeho zástupci.....	34
Obrázek 11 – Neamyloidní a amyloidní cesta proteolýzy amyloidového prekursorového proteinu	43
Obrázek 12 – Proces tvorby neurofibrilárních klubek hyperfosforylovaného τ proteinu	44
Obrázek 13 – Inhibitory cholinesteras a <i>N</i> -methyl-D-aspartátového receptoru	46
Obrázek 14 – Přírodní enhancery α -sekretas	48
Obrázek 15 – Přírodní inhibitory BACE1	49
Obrázek 16 – Přírodní inhibitory glykogensyntasy kinasy 3β	50
Obrázek 17 – Přírodní inhibitory prolyl oligopeptidasy	51
Obrázek 18 – Přírodní inhibitory cholinesteras	52
Obrázek 19 – Tautomerní formy 5-merkapt-2-nitrobenzoového aniontu	62
Obrázek 20 – Oxidační aktivita enzymu luciferasa	63
Obrázek 21 – TLC spojené podfrakce č. 82 – 94	64
Obrázek 22 – TLC podfrakce Z – 1.....	65
Obrázek 23 – pTLC podfrakce Z – 2/2	66
Obrázek 24 – TLC podfrakce Z – 3.....	67
Obrázek 25 – TLC podfrakce Z – 4/2	68
Obrázek 26 – TLC podfrakce Z – 5.....	69
Obrázek 27 – <i>O</i> -ethyllykorenin	71
Obrázek 28 – Epigalanthamin	72
Obrázek 29 – Galanthamin	73
Obrázek 30 – Galanthin	74
Obrázek 31 – Krinin.....	75
Obrázek 32 – Přehled struktur jednotlivých standardů.....	76

Tabulka 1 – Botanické třídění rodu <i>Narcissus</i> L. podle Mathewse a The Royal Horticultural Society.....	14
Tabulka 2 – Zahradnické třídění rodu <i>Narcissus</i> L. a charakteristika jednotlivých divizí.....	15
Tabulka 3 – Taxonomické zařazení <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. 'Dutch Master'	16
Tabulka 4 – Přehled IC ₅₀ lykorinu a jeho molekulárních komplexů vůči lidským nádorovým kulturám.....	23
Tabulka 5 – Antivirová aktivita lykorinu vůči viru ZIKA.....	24
Tabulka 6 – Přehled IC ₅₀ lykorinu, haemanthaminu a haemanthidinu vůči lidským nádorovým kulturám.....	29
Tabulka 7 – Přehled IC ₅₀ krininu a elwesinu vůči lidským nádorovým kulturám	30
Tabulka 8 – Antimalarická aktivita krininu, lykorinu a tazettinu	33
Tabulka 9 – Přehled IC ₅₀ montaninu vůči lidským nádorovým kulturám; rok 2007.....	35
Tabulka 10 – Přehled IC ₅₀ montaninu a coccininu vůči lidským nádorovým kulturám.....	35
Tabulka 11 – Přehled IC ₅₀ montaninu vůči lidským nádorovým kulturám; rok 2019	35
Tabulka 12 – Antiprotozoální aktivita pankracinu a nangustinu v porovnání se standardy.....	36
Tabulka 13 – Inhibiční vlastnosti amarylkovitých alkaloidů vůči cholinesterasám různého původu	37
Tabulka 14 – Přehled alkaloidů přítomných v kultivarech druhu <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	39
Tabulka 15 – Přehled indikací, nežádoucích účinků a kontraindikací EBM léčiv užívaných k terapii Alzheimerovy nemoci	46
Tabulka 16 – Výsledky měření IC ₅₀ izolovaných alkaloidů v porovnání vůči standardům	76
Rovnice 1 – Výpočet specifické otáčivosti	59
Rovnice 2 – Výpočet procentuální inhibice alkaloidů vůči lidské acetyl- a butyrylcholinesterase .	62

14. Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimerova nemoc
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
APP	Amyloidový prekurzorový protein
A β	Amyloid beta
BChE	Butyrylcholinesterasa
BPSD	Behaviorální a psychologické symptomy demence
d	Dublet
dd	Dublet dubletu
ddd	Dublet dubletu dubletu
dt	Dublet tripletu
ddt	Dublet dubletu tripletu
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
CDCl ₃	Deuterovaný chloroform; deuteriochloroform
EBM	Medicína založená na důkazech
EDTA	Ethylendioxytetraoctová kyselina
eeAChE	Acetylcholinesterasa druhu <i>Electrophorus electricus</i> L. (Gymnotidae) – Paúhoř elektrický
EGb 761	<i>Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum</i>
EGTA	Tetrasodná sůl ethylenglykol-bis(-aminoethylether)-N,N,N,N-tetraoctové kyseliny
EI	Elektronová ionizace
eqBChE	Butyrylcholinesterasa druhu <i>Equus f. caballus</i> L. (Equidae) – Kůň domácí
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
GSK-3 β	Glykogensyntasa kinasa 3 β
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
huAChE	Lidská acetylcholinesterasa
huBChE	Lidská butyrylcholinesterasa

ChE	Cholinesterasa
IC ₅₀	Koncentrace vyjadřující snížení aktivity enzymu na 50 %
<i>J</i>	Interakční konstanta
MHz	Megahertz; jednotka frekvence
MS	Hmotnostní spektrometrie
nAChRs	Nikotinový acetylcholinový receptor
NFTs	Neurofibrilární klubka
n.d.	Neurčeno; nedefinováno
nm	Nanometr; jednotka délky
PBS	Fosfátový pufr
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových resp. oxóniových kationtů v roztoku
POP	Prolyl oligopeptidasa; syn. Prolyl endopeptidasa
ppm	Částic na jeden milion (Parts per million)
pTLC	Preparativní chromatografie na tenké vrstvě
R _F	Retenční faktor
RHS	The Royal Horticultural Society
rpm	Počet otáček za minutu
RVE	Vakuová rotační odparka
s	Singlet
q	Kvartet
t	Triplet
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
¹ H NMR	Vodíková nukleární magnetická rezonance
¹³ C NMR	Uhlíková nukleární magnetická rezonance
λ	Lambda; vlnová délka světla
μM	Mikromolární koncentrace

15. Seznam použitých zkratek nádorových a nenádorových buněčných linií

A2780	Lidský karcinom ovarii
A-431	Lidský skvamocelulární karcinom
A549	Lidský karcinom plic
AGS	Lidský adenokarcinom žaludku
BCA-1	Lidský karcinom prsu
BL-6	Myší melanom
BT-549	Lidský karcinom prsu
COL-2	Lidský karcinom tlustého střeva
COLO-201	Lidský kolorektální adenokarcinom
DLD-1	Lidský kolorektální adenokarcinom
H460	Lidský velkobuněčný karcinom plic
H1299	Lidský nemalobuněčný plicní karcinom
H1993	Lidský nemalobuněčný plicní karcinom
HCT15	Lidský kolorektální karcinom
HCT116	Lidský kolorektální karcinom
HeLa	Lidský karcinom děložního čípku
HepG2	Lidský hepatocytární karcinom
HL-60	Lidská promyelocytární leukemie
HL-60/Dox	Lidská multidrug rezistentní promyelocytární leukemie
Hs578T	Lidský karcinom prsu
HT-29	Lidský kolorektální adenokarcinom
HT-1080	Lidský fibrosarkom
Huh7	Lidský hepatocelulární karcinom
Jurkat	Lidský leukemický lymfoblast T buněk
K562	Erythroleukemie
KB	Lidský epidermální karcinom ústní dutiny
KB-V	Lidský vinblastin rezistentní epidermální karcinom ústní dutiny

L6	Kryší zdravé myoblasty
L02	Lidské zdravé jaterní buňky
L5178	Myší lymfom brzlíku
LMTK	Myší linie fibroblastů rezistentních vůči bromdeoxyuridinu
LNCaP	Lidský hormon dependentní karcinom prostaty
LUC-1	Lidský karcinom plic
MCF-7	Lidský adenokarcinom prsu
MDA-MB-231	Lidský adenokarcinom prsu
MOLT-4	Lidská akutní lymfoblastická leukémie T buněk
MRC-5	Lidská zdravá plicní tkáň čtrnácti týdenního mužského plodu
NHDF	Lidské zdravé kožní fibroblasty
NSCLC	Nemalobuněčný bronchogenní karcinom
OVCAR3	Lidský karcinom ovarii
PANC-1	Lidský karcinom pankreatu
P-388	Myší lymfom
RAW 264.7	Myší makrofágová linie zdravých buněk
RXF393	Lidský karcinom ledvin
SAOS-2	Lidský primární osteogenní sarkom
SK-MEL-28	Lidský maligní melanom kůže
SKW-3	Lidská akutní lymfoblastická leukemie T buněk
SW480	Lidský kolorektální adenokarcinom
U87	Lidský glioblastom
VERO	Primáti zdravé ledvinné buňky
ZR-75-1	Lidský adenokarcinom prsu