UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNÓZIE A FARMACEUTICKEJ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Izolácia alkaloidov z *Narcissus poeticus recurvus* a ich biologická aktivita II

Isolation of alkaloids from *Narcissus poeticus recurvus* and their biological activity II

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Rudolf Vrabec, Ph.D.

Vedúca katedry: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2025

Erika Šrámková

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím autorským dielom a vypracovala som ju samostatne pod vedením školiteľa PharmDr. Rudolfa Vrabca, Ph.D. Všetky použité zdroje a literatúra, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú citované a uvedené v zozname použitej literatúry. Táto práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

Erika Šrámková

Poďakovanie

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi PharmDr. Rudolfovi Vrabcovi, Ph.D. za cenné rady a podporu pri práci v laboratóriu aj pri písaní diplomovej práce, pomoc pri interpretácii plynového chromatogramu a určovaní optickej aktivity izolovaných štruktúr, ako aj za trpezlivosť, ochotu a čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som chcela poďakovať PharmDr. Daniele Suchánkovej, Ph.D. za zmeranie biologickej aktivity izolovaných látok a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za vypracovanie NMR analýzy. Taktiež ďakujem svojej rodine a priateľom za podporu počas celého štúdia na FaF UK v Hradci Králové.

OBSAH

Zoznam skratiek 7

Zoznam obrázkov 8

Zoznam tabuliek 9

1. Úvod 10

2. Cieľ práce 12

3. Teoretická časť 13

3.1. Čeľaď Amaryllidaceae 13

3.1.1. Rod *Narcissus* 13

3.1.1.1. Taxonómia 14

3.1.1.2. *Narcissus poeticus* 14

3.1.1.2.1. *Narcissus poeticus* var. *recurvus* 14

3.2. Alkaloidy z čeľade Amaryllidaceae 15

3.2.1. Biosyntéza 15

3.2.2. Základné štruktúrne typy alkaloidov čeľade Amaryllidaceae 16

3.2.2.1. Lykorínový typ 18

3.2.2.2. Homolykorínový typ 19

3.2.2.3. Haemanthamínový a krinínový typ 19

3.2.2.4. Tazettínový typ 21

3.2.2.5. Galantamínový typ 22

3.2.2.6. Montanínový typ 23

3.2.2.7. Pankratistatínový typ 24

3.2.2.8. Mesembranový typ 25

3.3. Alzheimerova choroba 26

3.3.1. Klinický obraz 26

3.3.2. Rizikové faktory 27

3.3.3. Patogenéza 28

3.3.3.1. β-amyloidná teória 29
3.3.3.2. Hypotéza τ-proteínu 30
3.3.3.3. Cholinergná hypotéza 31
3.3.3.4. Teória glutamátovej neurotoxicity 31
3.3.4. Diagnostika 32
3.3.5. Liečba 33
3.3.5.1. Farmakologická liečba 33
3.3.5.2. Nefarmakologická liečba 37
4. Experimentálna časť 38
4.1. Použitý materiál 38
4.1.1. Chemikálie použité pri izolácii a identifikácii alkaloidov 38
4.1.2. Chemikálie a enzýmy použité pri meraní inhibície cholínesteráz 38
4.1.3. Mobilné fázy 39
4.1.4. Prístroje a software 39
4.1.5. Pomocný materiál 40
4.2. Všeobecné postupy 40
4.2.1. Príprava liatych dosiek 40
4.2.2. Nanášanie a vyvíjanie vzorky 41
4.2.3. Detekcia alkaloidov 42
4.2.4. Elúcia 43
4.2.5. Odparovanie 43
4.2.6. Sušenie a skladovanie 44
4.3. Získanie alkaloidných frakcií 45
4.4. Izolácia alkaloidov 46
4.4.1. Frakcia NPR-3 46
4.4.2. Frakcia NPR-4 49
4.4.3. Frakcia NPR-11 49

4.5. Metódy použité na identifikáciu izolovaných alkaloidov 53
4.5.1. Analýza GC/MS-EI 53
4.5.2. Analýza NMR 54
4.5.3. HRMS analýza 54
4.5.4. Optická otáčavosť 55
4.6. Testovanie biologickej aktivity 55
4.6.1. Roztoky činidiel na stanovenie inhibičnej aktivity voči hAChE a hBuChE 55
4.6.2. Príprava fosfátového pufru 56
4.6.3. Príprava enzýmov 56
4.6.4. Stanovenie aktivity enzýmov 56
4.6.5. Stanovenie inhibičnej aktivity voči cholínesterázam 56
5. Výsledky 58
5.1. Štruktúrna analýza izolovaných látok 58
5.1.1. NPR-3-4b-1 58
5.1.2. NPR-11-2a-1: Galantamín 60
5.1.3. NPR-11-4-1 61
5.1.4. NPR-11-5a: Lykorín 63
5.2. Biologická aktivita izolovaných alkaloidov 64
6. Diskusia a záver 65
7. Abstrakt 67
8. Abstract 68
9. Zoznam použitej literatúry 69

Zoznam skratiek

AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholín
AChE	Acetylcholínesteráza
APP	Amyloidný prekurzorový proteín
ATChI	Acetylthiocholín jodid
Aβ	β-amyloid
BuChE	Butyrylcholínesteráza
BuTChI	Butyrylthiocholín jodid
EI	Elektrónová ionizácia
ESI	Ionizácia elektrosprejom
FDA	Food and Drug Administration
GC	Plynová chromatografia
hAChE	Ľudská acetylcholínesteráza
hBuChE	Ľudská butyrylcholínesteráza
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HRMS	Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením
ChAT	Cholínacetyltransferáza
IC_{50}	Inhibičná koncentrácia látky, pri ktorej je inhibovaných 50 % enzýmu
LC	Kvapalinová chromatografia
MF	Mobilná fáza
MS	Hmotnostná spektrometria
NMDA	N-methyl-D-aspartátové receptory
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia
PAL	Fenylalanín amóniová lyáza
PDA	Detektor s diódovým poľom
RHS	Royal Horticultural Society
TLC	Tenkovrstvová chromatografia
TYDC	L-tyrozíndekarboxyláza
Var.	Varieta
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

Zoznam obrázkov

Obr. 1: *Narcissus poeticus* var. *recurvus* (15). 15
Obr. 2: Norbelladínová biosyntetická cesta AA. 16
Obr. 3: Základné štruktúrne typy alkaloidov čeľade Amaryllidaceae. 17
Obr. 4: Alkaloidy lykorínového štruktúrneho typu. 18
Obr. 5: Alkaloidy homolykorínového štruktúrneho typu. 19
Obr. 6: Alkaloidy haemanthamínového a krinínového štruktúrneho typu. 20
Obr. 7: Alkaloidy tazettínového štruktúrneho typu. 21
Obr. 8: Alkaloidy galantamínového štruktúrneho typu. 23
Obr. 9: Alkaloidy montanínového štruktúrneho typu. 24
Obr. 10: Alkaloidy pankratistatínového štruktúrneho typu. 25
Obr. 11: Alkaloid mesembranového štruktúrneho typu. 25
Obr. 12: Štruktúra mozgu a neurónov a) zdravý mozog, b) mozog postihnutý AD (37). 29
Obr. 13: Tvorba neurofibrilárnych klbiek (42). 30
Obr. 14: Štruktúra donepezilu. 34
Obr. 15: Štruktúra rivastigmínu. 35
Obr. 16: Štruktúra memantínu. 36
Obr. 17: Sušenie liatych dosiek. 41
Obr. 18: Nanášanie vzorky na chromatografickú dosku. 41
Obr. 19: Detekcia alkaloidov pomocou UV svetla (254 nm, 366 nm) a Dragendorffovho činidla. 42
Obr. 20: Elúcia. 43
Obr. 21: Vákuová odparka. 44
Obr. 22: Sušenie v exikátore. 44
Obr. 23: Frakcie získané z rastliny *Narcissus poeticus* var. *recurvus* s vyznačenými frakciami použitými v tejto práci (56). 46
Obr. 24: TLC doštička frakcie NPR-3 s detekciou Dragendorffovým činidlom. 46
Obr. 25: Kontrolné TLC frakcie NPR-3. 47
Obr. 26: Čistenie frakcie NPR-3-4 pomocou MF 1. 47
Obr. 27: Schéma separácie NPR-3. 48
Obr. 28: Schéma separácie NPR-4. 49
Obr. 29: Liata doštička s frakciou NPR-11 vyvinutá v mobilnej fáze MF 6. 50
Obr. 30: NPR-11-2a–kontrolné TLC. 50
Obr. 31: TLC doštička podfrakcie NPR-11-4 vyvinutá v MF 9. 51

Obr. 32: TLC analýza podfrakcie NPR-11-5 v MF 10.....52
Obr. 33: Schéma separácie NPR-11.....53
Obr. 34: Štruktúrny vzorec NPR-3-4b-1. 58
Obr. 35: Štruktúrny vzorec galantamínu.....60
Obr. 36: Štruktúrny vzorec NPR-11-4-1. 61
Obr. 37: Štruktúrny vzorec lykorínu 63

Zoznam tabuliek

Tab. 1: Odrody *N. poeticus* (13).....14
Tab. 2: Výsledky inhibičnej aktivity získaných alkaloidov voči ľudským cholínesterázam...64

1. Úvod

Používanie rastlín na liečebné účely sprevádza človeka už od nepamäti. Od pradávna ľudia čerpali z prírody nielen potravu, ale aj prostriedky na liečenie a zmiernenie zdravotných problémov. Keďže poznatky o príčinách ochorení či účinných látkach v rastlinách neexistovali, ich využívanie bolo založené najmä na pozorovaní a skúsenostiach odovzdávaných z generácie na generáciu. Existuje viacero archeologických dôkazov, ktoré potvrdzujú dlhú históriu liečenia pomocou rastlín. Najstarší písomný dôkaz pochádza zo sumerskej hlinenej tabuľky starej približne 5000 rokov. Obsahuje dvanásť receptov, ktoré uvádzajú viac než 250 rôznych rastlín. Ďalším dôkazom je kniha z čínskej civilizácie z obdobia okolo 2500 pred n. l., v ktorej sa opisuje 365 drog a mnohé z nich sú používané dodnes, napríklad rebarbora, gáfor, čajovník, ženšen, škoricová kôra či chvojník. V starovekom Egypte vznikol Ebersov papyrus, datovaný približne do roku 1550 pred n. l., ktorý obsahuje okolo 800 receptov a spomína viac ako 700 rastlín. Súčasná veda potvrdzuje účinnosť mnohých týchto tradičných rastlín. Lieky rastlinného pôvodu sú dnes významnou súčasťou farmakoterapie a predstavujú alternatívu alebo doplnok k syntetickým liekom (1).

Prírodné látky sú zdrojom biologicky aktívnych zlúčenín, ktoré významne prispeli k vývoju nových liečiv. Medzi najvýznamnejšie sekundárne metabolity rastlín patria alkaloidy, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri vývoji liekov, predovšetkým vďaka svojej štruktúrnej rozmanitosti (2).

Alkaloidy sú organické zlúčeniny odvodené od aminokyselín, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú dusík viazaný v heterocyklickom kruhu. Ak dusík nie je súčasťou heterocyklu, hovoríme o protoalkaloidoch. V prípade, že dusík v molekule síce prítomný je, ale východiskovou látkou nie je aminokyselina, ide o pseudoalkaloidy. Presný význam alkaloidov v rastlinách zatiaľ nie je úplne objasnený, no predpokladá sa, že vďaka svojmu toxickému účinku môžu plniť ochrannú funkciu pred parazitmi a bylinožravcami. K čeľadiam, ktoré sú známe obsahom alkaloidov, patria napríklad Papaveraceae, Solanaceae, Rubiaceae, Berberidaceae a Amaryllidaceae (3).

Rastliny z čeľade Amaryllidaceae sú známe nielen pre svoje liečivé účinky, ale vďaka kvetom aj ako obľúbené okrasné rastliny. Alkaloidy z tejto skupiny sa vyznačujú rôznorodou biologickou aktivitou. Boli zaznamenané protirakovinové, antivírusové, antibakteriálne, antimalarické, antimykotické a tiež inhibičné účinky na acetylcholínesterázu. Významným predstaviteľom z tejto skupiny je galantamín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v mnohých zástupcoch čeľade Amaryllidaceae. Tento alkaloid bol schválený americkým Úradom pre

kontrolu potravín a liečiv (FDA) ako liečivo na zmiernenie príznakov Alzheimerovej choroby, práve vďaka schopnosti inhibovať enzým AChE. Okrem galantamínu majú sľubný potenciál aj iné Amaryllidaceae alkaloidy ako lykorín, haemanthamín či narciklasín, ktoré sa skúmajú ako možné protinádorové látky. Táto skupina zlúčenín preto predstavuje cenný zdroj pre vývoj nových liekov (4).

2. Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo spracovať pridelené frakcie z *Narcissus poeticus* var. *recurvus* za účelom izolovať čisté alkaloidy, identifikovať ich štruktúru a stanoviť ich biologickú aktivitu, najmä v súvislosti s terapiou Alzheimerovej choroby. Súčasťou práce bolo tiež vyhodnotenie získaných výsledkov a spísanie diplomovej práce.

3. Teoretická časť

3.1. Čeľaď Amaryllidaceae

Čeľaď Amaryllidaceae zahŕňa približne 80 rodov a 1600 druhov, ktoré sa vyskytujú po celom svete, pričom najväčšie zastúpenie majú v teplých oblastiach, ako sú Argentína, Brazília, Mexiko a ďalšie tropické či subtropické oblasti (5). Do tejto čeľade patria trvácne rastliny s cibuľovými hľuzami, podzemkami alebo s podzemnými cibuľami. Listy sú čiarkovité a typické pre túto čeľaď je prítomnosť obojpohlavných kvetov so spodným semenníkom. Plodom sú tobolky alebo bobule (6). Rastliny z tejto čeľade sa pestovali nielen ako okrasné rastliny, ale aj pre využitie v ľudovom liečiteľstve proti rôznym chorobám (7). Ako príklad si môžeme uviesť olej extrahovaný z *Narcissus poeticus*, ktorý sa po staročia používal na liečbu nádorov maternice (4). Hipokrates používal tento olej z narcisu už v 4. storočí pred Kristom (7).

Tieto rastliny produkujú charakteristickú skupinu sekundárnych metabolitov známych ako Amaryllidaceae alkaloidy (AA). Prvým izolovaným zástupcom bol v roku 1877 lykorín z *Narcissus pseudonarcissus* a v súčasnosti je už identifikovaných viac než 600 rôznych alkaloidov tohto typu. (7). Vedecké výskumy AA prebiehajú už takmer 200 rokov. V posledných desaťročiach boli mnohé AA izolované a skúmané na ich biologickú aktivitu. Problémom je dostupnosť AA, pretože v prírodných zdrojoch sa nachádzajú v malom množstve, preto sa výskumní pracovníci zaoberajú ich syntézou (8).

3.1.1. Rod *Narcissus*

Najbežnejší rod čeľade Amaryllidaceae je rod *Narcissus* L., ktorý zahŕňa 80–100 voľne žijúcich druhov. Nájdeme ich najmä v juhozápadnej Európe a v severnej Afrike (9). Ich výskyt je rôznorodý. Môžeme ich nájsť v nížinách, na brehoch riek, v lese, na lúkach ale aj v horských oblastiach (8). Z botanického hľadiska sú to trvácne jednoklíčnolistové rastliny, ktoré dosahujú výšku 20–40 cm a rozmnožujú sa zvyčajne cibuľami. Listy sú jednoduché, celistvookrajové v prízemnej ružici (10). Väčšina druhov kvitne koncom zimy a na jar. Výnimku tvorí päť druhov, ktoré kvitnú na jeseň (*N. broussonetii; N. cavanillesii; N. elegans; N. serotinus; N. viridiflorus*) (11). Kvety sú obojpohlavné, zvyčajne nápadné a niektoré sú veľmi voňavé (8, 10). Sú zložené z dvoch vrstiev, pričom v strede sa nachádza pakoruna obklopená šiestimi okvetnými lístkami, ktoré sú v dolnej časti zrastené. Vo vnútornej časti kvetu sa zvyčajne nachádza šesť tyčiniek a tri piestiky, ktoré tvoria gynéceum. Plod je tobolka (10, 11). Opeľovačom kvetov je hmyz, najmä včely, motýle a muchy (8).

3.1.1.1. Taxonómia

Ríša: Plantae – Rastliny

Oddelenie: Magnoliophyta – Krytosemenné rastliny

Trieda: Liliopsida – Jednoklíčnolistové rastliny

Rad: Asparagales – Asparágotvaré

Čeľaď: Amaryllidaceae – Amarylkovité

Rod: *Narcissus* L. – Narcis (12)

3.1.1.2. *Narcissus poeticus*

Spoločnosť Royal Horticultural Society (RHS) uznala 6 odrôd *N. poeticus* (Tab. 1) (13).

Tab. 1: Odrody *N. poeticus* (13).

	Odroda	Popis
Narcissus poeticus	var. *poeticus*	Diskovitá pakoruna
	var. *hellenicus*	Miskovitá pakoruna, priemer kvetov 3,5–5 cm
	var. *majalis*	Pakoruna s červeným okrajom nad bielou zónou, priemer kvetov 5–7 cm
	var. *physaloides*	Zväčšený kvetinový púčik
	var. *recurvus*	Miskovitá pakoruna s červeným okrajom nad zelenožltou zónou, priemer kvetov 5–7 cm
	var. *verbanensis*	Priemer kvetov 3,5–5 cm

3.1.1.2.1. *Narcissus poeticus* var. *recurvus*

Cibuľovitá trvalka, ktorá dorastá do výšky 35 cm. Pestuje sa v stredne vlhkých, priepustných pôdach na slnku alebo v čiastočnom tieni. Na jar na stonke vyrastá jeden voňavý kvet (Obr. 1). Okvetné lístky sú biele, s červeno lemovanou pakorunou a zeleným okom. Často sa využíva pre jej výzor ako okrasná rastlina do kvetinových záhonov (14).

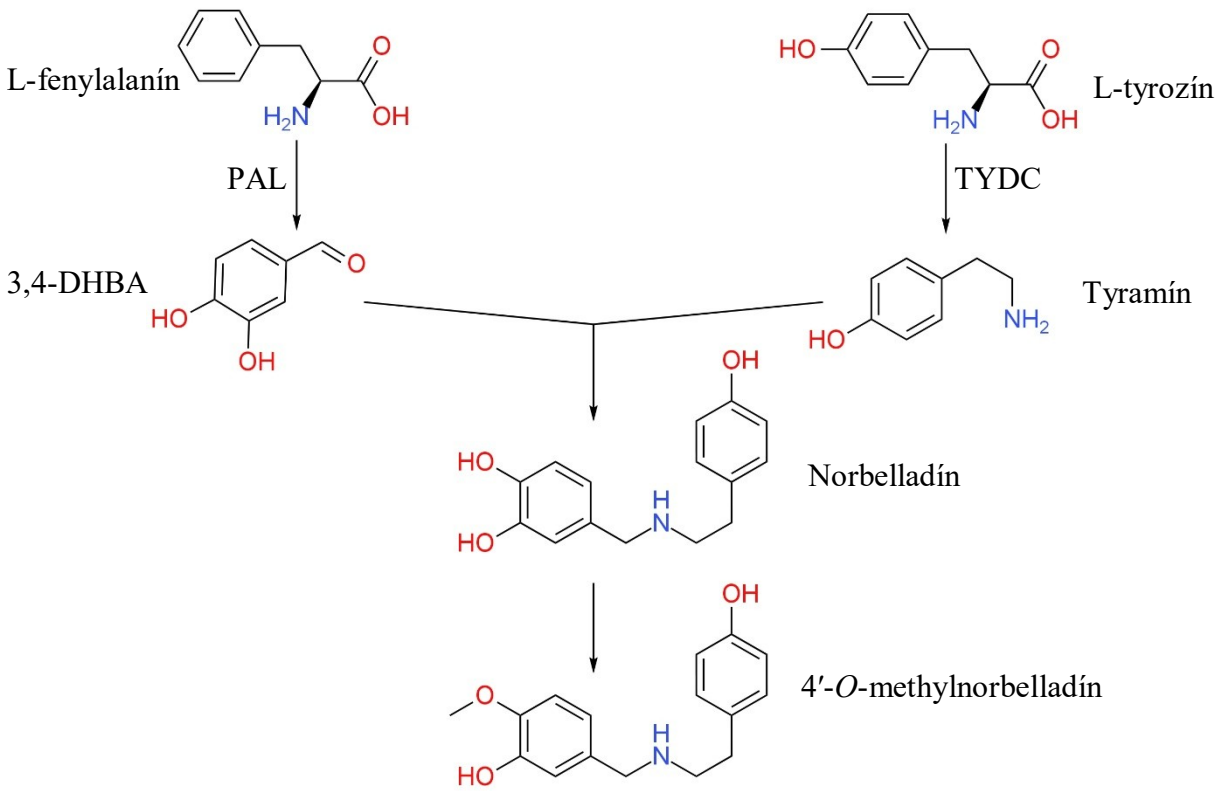
Obr. 1: *Narcissus poeticus* var. *recurvus* (15).

3.2. Alkaloidy z čeľade Amaryllidaceae

Rastliny z čeľade Amaryllidaceae produkujú skupinu alkaloidov, ktoré sa súhrnne označujú ako AA (7). Nachádzajú sa najmä v cibuliach rastlín, ale v menšej miere ich nájdeme aj v iných častiach (16). Dodnes v rámci tejto čeľade bolo izolovaných a štruktúrne popísaných viac ako 650 alkaloidov, ktoré sa štruktúrne líšia, avšak sa považujú za biogeneticky príbuzné (8, 17). Dôvod prečo AA upútali pozornosť je ich široké spektrum farmakologických účinkov. Ako inhibícia acetylcholínesterázy (AChE), inhibícia butyrylcholínesterázy (BuChE), protinádorové, antivírusové, antibakteriálne, analgetické, antifungálne a antimalarické vlastnosti. Medzi najznámejší AA patrí galantamín, ktorý pôsobí ako inhibítor AChE a používa sa pri liečbe Alzheimerovej choroby (AD) (7).

3.2.1. Biosyntéza

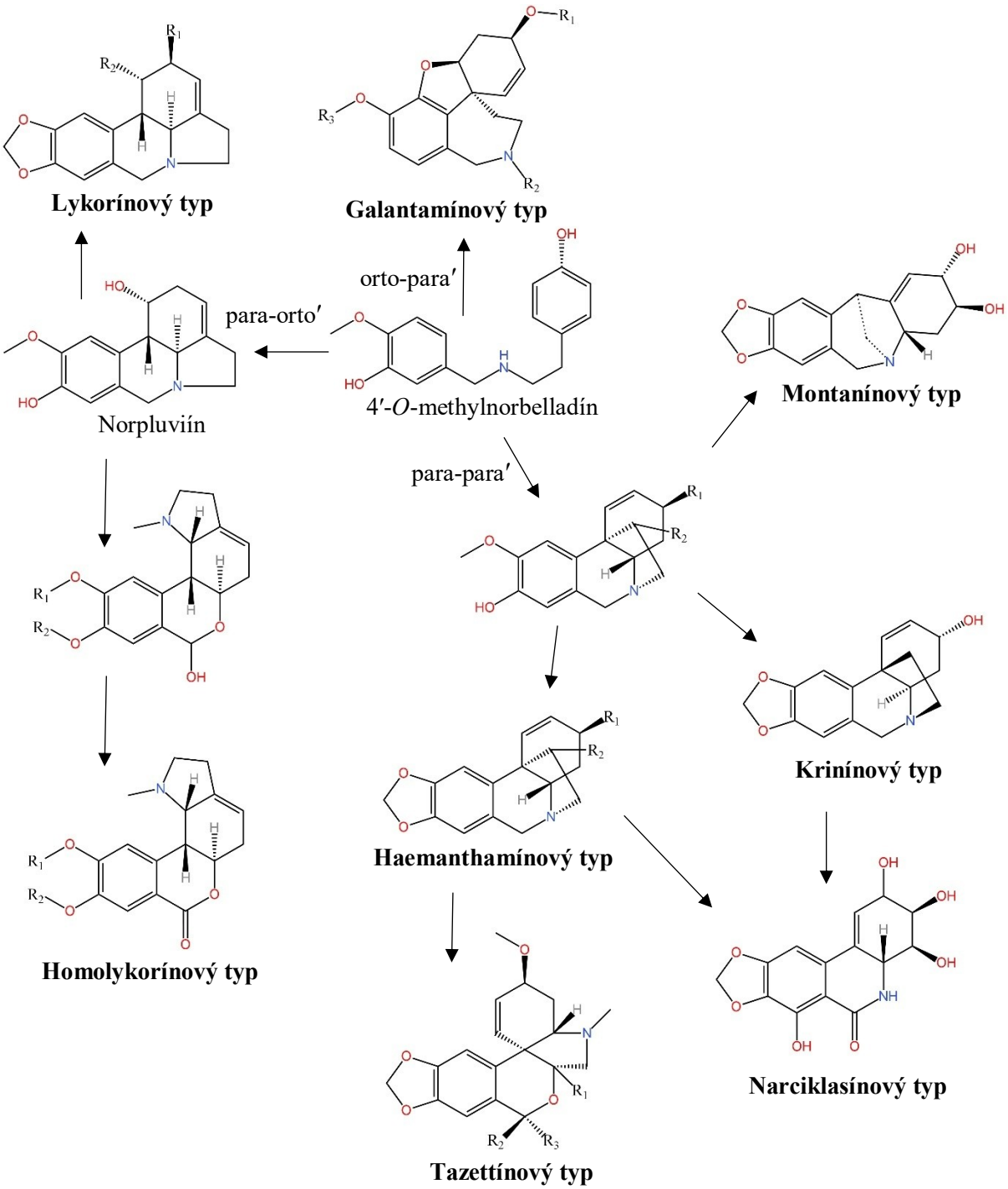
AA z pohľadu biosyntézy vznikajú norbelladínovou cestou (Obr. 2), ktorá dostala názov podľa kľúčového medziproduktu norbelladínu. Prvým stupňom je premena aromatických aminokyselín L-tyrozínu a L-fenylalanínu (18). L-tyrozín sa dakarboxyluje pomocou L-tyrozíndekarboxylázy (TYDC) na tyramín a L-fenylalanín reaguje za prítomnosti fenylalanín amóniovej lyázy (PAL) za vzniku 3,4-dihydroxybenzaldehydu (3,4-DHBA) (4, 19). Po niekoľkých reakčných stupňoch z tyramínu a 3,4-DHBA vznikne norbelladín a následne 4′-*O*-methylnorbelladín (16).



Obr. 2: Norbelladínová biosyntetická cesta AA.

3.2.2. Základné štruktúrne typy alkaloidov čeľade Amaryllidaceae

Cyklizáciou v molekule 4′-*O*-methylnorbelladínu v polohe orto-para′, para-para′ a para-orto′ dochádza k tvorbe základných štruktúrnych typov AA (Obr. 3) (20). Medzi tieto základné typy patria: lykorínový, homolykorínový, haemanthamínový, krinínový, galantamínový, tazettínový, montanínový, pankratistatínový a mesembránový typ (21). Okrem týchto typov bolo popísaných ďalších 13 štruktúrnych typov AA, ktoré zvyčajne obsahujú len jeden alkaloid. V rode *Narcissus* L. boli identifikované aj zlúčeniny, ktoré vznikli spojením dvoch odlišných štruktúrnych typov. Napríklad spojením galantamínového a galantindolového štruktúrneho typu vznikol pallidiflorín (18).



Obr. 3: Základné štruktúrne typy alkaloidov čeľade Amaryllidaceae.

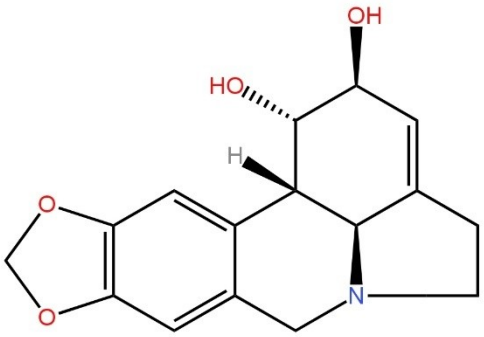
3.2.2.1. Lykorínový typ

Do tejto skupiny patria alkaloidy s pyrolo[de]fenantridínovým skeletom, ktorý vzniká cyklizáciou v molekule 4′-*O*-metylnorbelladínu v polohe orto-para′. Z 4′-*O*-metylnorbelladínu vzniká medziprodukt noroxopluviín, ktorý sa následne redukuje na norpluviín a z neho vzniká karanín, ktorý sa hydroxyluje na lykorín (17).

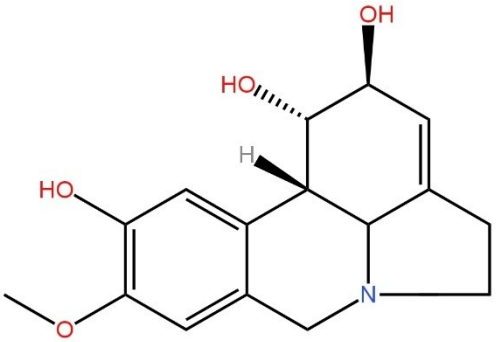
Hlavným zástupcom tejto skupiny je lykorín, ktorý bol izolovaný v roku 1877 z *Narcissus pseudonarcissus* L. a jeho štruktúru v roku 1956 detailnejšie popísal Nagakawa a spol. (22). Okrem lykorínu sem zaraďujeme aj látky ako pseudolykorín (Obr. 4), lykorín-2-ón, 1-*O*-acetyllykorín, 1,2-*O*-diacetyllykorín, amarbellizín, galantín, norpluviín, lykorén, ungeremín, karanín, 1,2-epoxylykorín a ďalšie (16, 23).

Lykorín vykazuje viacero biologických vlastností. U rastlín má schopnosť inhibovať syntézu kyseliny askorbovej, je účinný na niektoré druhy vírusov ako napríklad poliovírus. Taktiež vykazuje antimykotické pôsobenie na *Saccharomyces cerevisiae* a má preukázanú protinádorovú aktivitu (16).

Vo všeobecnosti sa galantamínový a lykorínový typ vyznačujú inhibičnou aktivitou k AChE. Látky lykorínového typu sú voči glantamínovému typu menej účinné a ich aktivita súvisí so substitúciou v polohách C-1 a C-2 (20). Aj keď lykorín nevykazuje žiadnu aktivitu k AChE, niektoré jeho deriváty (či už prirodzene vyskytujúce sa v rastlinách alebo získané syntetickou cestou) sú inhibítormi AChE. Ako už bolo spomenuté, podmienkou pre tento účinok je substitúcia na C-1 a C-2. Jedná sa napríklad o 1-acetyllykorín, ktorý je silný inhibítor AChE. 2-Acetyllykorín a 1,2-diacetyllykorín majú len slabú inhibičnú aktivitu. Ungiminorín má inhibičnú aktivitu k AChE 6 až 10-krát silnejšiu ako galantamín (24).



Lykorín



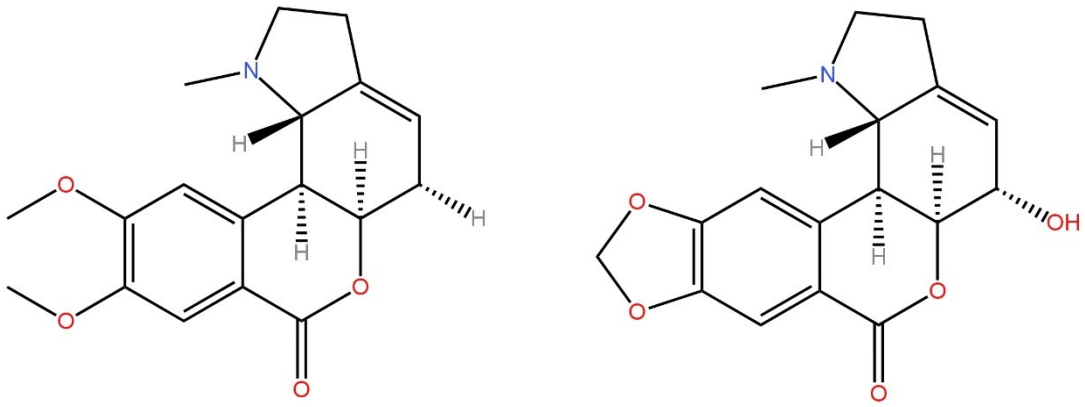
Pseudolykorín

Obr. 4: Alkaloidy lykorínového štruktúrneho typu.

3.2.2.2. Homolykorínový typ

Oxidačnou väzbou v molekule 4′-*O*-metylnorbelladínu v polohe orto-para′ dochádza k tvorbe alkaloidov lykorínového typu, z ktorého reštrukturalizáciou vzniká homolykorínový štruktúrny typ. Základný skelet tvorí tetracyklický 2-benzopyrano[3,4-g]indol. Do tejto skupiny patrí celá rada alkaloidov napr. homolykorín, masonín, odulín, 8-*O*-demethylhomolykorín, 9-*O*-demetylhomolykorín, lycorenín a ďalšie (17, 22).

Homolykorín, hippeastrín (Obr. 5) a 8-*O*-demetylhomolykorín vykazujú cytotoxickú aktivitu, ktorá však nie je selektívna a pôsobí aj na nenádorové bunky (16). Homolykorín má antiretrovírusovú aktivitu, inhibičnú aktivitu k AChE a BuChE, a tiež hypotenzný účinok, ktorý bol skúšaný u potkanov (10, 25). U hippeastrínu bola zistená antimykotická aktivita proti *Candida albicans* a antivírová aktivita proti vírusom *Herpes simplex*. Aj keď do tejto skupiny patrí veľké množstvo aklaloidov, bioaktivita väčšiny z nich je neznáma (16, 25).



Homolykorín Hippeastrín

Obr. 5: Alkaloidy homolykorínového štruktúrneho typu.

3.2.2.3. Haemanthamínový a krinínový typ

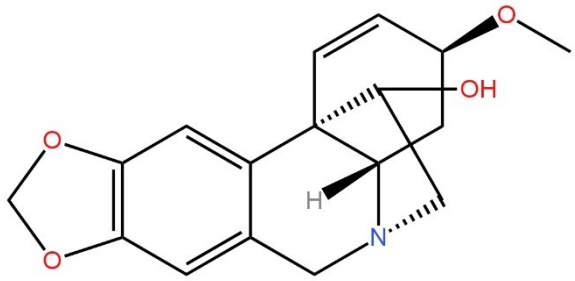
Tieto štruktúrne typy alkaloidov sú odvodené od 5,10b-ethanofenantridínového skeletu, ktorý vzniká oxidačnou väzbou v para-para′ polohách. Hlavný rozdiel medzi jednotlivými typmi spočíva v priestorovej orientácii etánového mostíka na pozícii 5,10b. Zatiaľ čo haemanthamínový typ charakterizuje β-orientácia, krinínový typ sa vyznačuje α-orientáciou tohto mostíka (Obr. 6) (8). V niektorých zdrojoch sa haemanthamínový a krinínový typ zaraďujú do spoločnej skupiny krinínových alkaloidov, kde haemanthamínový typ nesie označenie β-krinínový a krinínový typ sa označuje ako α-krinínový (26).

Medzi významných predstaviteľov týchto alkaloidových typov patria látky ako haemanthamín, haemanthidín, 8-*O*-demethylmaritidín, vittatín, seko-isopowellaminon, maritidín, krinamín a papyramín (10, 16, 18).

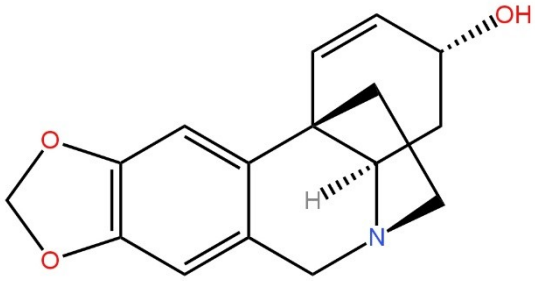
Alkaloidy haemanthamín, haemanthidín, papyramín, krinamín a maritidín vykazujú cytotoxický účinok voči nádorovým bunkám. Experimentálne štúdie preukázali, že krinamín a haemanthamín selektívne indukujú apoptózu v bunkách pečeňového karcinómu potkana, pričom pri rovnakej koncentrácii nevykazovali cytotoxický efekt na ľudské embryonálne bunky obličiek HEK 293T. Mechanizmus tohto účinku sa predpokladá na úrovni inhibície proteosyntézy (16). V odborných publikáciách sa uvádza, že protinádorový efekt alkaloidov s 5,10b-etánovým mostíkom je viazaný na β-konfiguráciu. Pre ilustráciu možno uviesť ambellín, ktorý nesie konfiguráciu mostíka v α-polohe. Z dostupných dát vyplýva, že táto látka nevykazuje protinádorovú aktivitu voči skúmaným nádorovým bunkovým líniám (10). Haemanthamín patrí medzi alkaloidy s viacerými biologickými aktivitami. Okrem cytotoxického účinku vykazuje aj antimalarickú aktivitu proti kmeňom *Plasmodium falciparum*, ďalej hypotenzívny účinok a antiretrovírusovú aktivitu. Maritidín a vittatín preukázali cytotoxickú aktivitu voči bunkovým líniám adenokarcinómu hrubého čreva HT29, karcinómu obličkových buniek RXF393 a karcinómu pľúc. Zároveň vykazovali antibakteriálny účinok proti gramnegatívnej *Escherichia coli* a grampozitívnemu kmeňu *Staphylococcus aureus* (25).

Čo sa týka inhibície cholínesteráz, samotný haemanthamín neprejavuje žiadnu inhibičnú aktivitu, avšak jeho deriváty (predovšetkým aromatické estery), túto aktivitu prejavujú. Najvýraznejší inhibičný účinok bol zaznamenaný u derivátov 11-*O*-benzoylhaemanthamíne, 11-*O*-(2-metylbenzoyl)haemanthamíne a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamíne (10).

Medzi druhy narcisov, ktoré produkujú alkaloidy haemanthamínového a krinínového typu sa zaraďujú *N. poeticus, N. tazetta, N. pseudonarcissus, N. papyraceus* (10).



Haemanthamín



Krinín

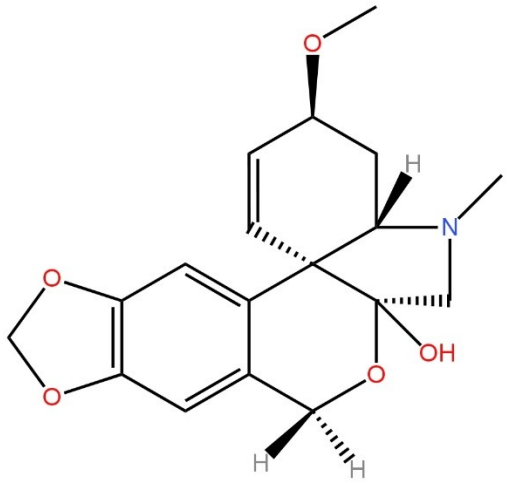
Obr. 6: Alkaloidy haemanthamínového a krinínového štruktúrneho typu.

3.2.2.4. Tazettínový typ

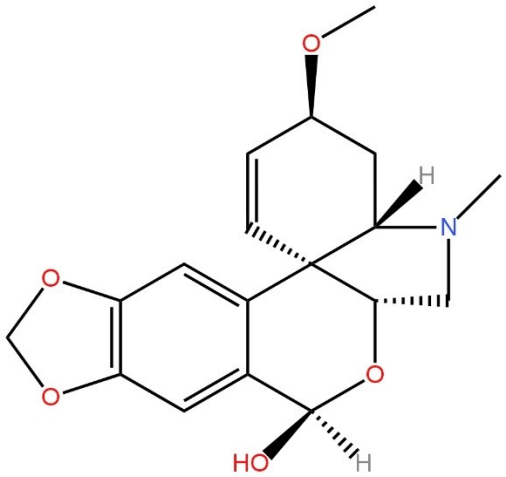
Základnú štruktúru pretazettínových alkaloidov, známych aj ako tazettínové, tvorí skelet 2-benzopyrano[3,4-c]indol, ktorý vzniká oxidačnou väzbou medzi fenolickými skupinami v para–para′ polohách. V rámci čeľade Amaryllidaceae bolo identifikovaných viac ako 30 pretazettínových zlúčenín, medzi ktoré patria napríklad tazettín, pretazettín (Obr. 7), 6-deoxytazettín a 3-epimakronín (18, 27). Tieto alkaloidy boli identifikované v druhoch *N. tazetta, N. confusus, N. bulbocodium, N. obesus, N. pallidiflorus, N. panizzianus* (10).

Tazettín z hľadiska liečby neurodegeneratívnych ochorení, ako je Alzheimerova choroba, nevykazuje významnú inhibičnú aktivitu voči AChE a BuChE. V dostupnej literatúre je však popísaná jeho hypotenzívna a antimalarická aktivita. Jeho cytotoxická aktivita je zanedbateľná, čím sa líši od svojho biosyntetického prekurzora pretazettínu, ktorý má výrazné protinádorové a antivírusové vlastnosti. Zmena biologickej aktivity medzi tazettínom a pretazettínom je daná drobným štruktúrnym rozdielom, konkrétne polohou hydroxylovej skupiny na atómoch uhlíka C-6a a C-8 (10).

Pretazettín patrí medzi najaktívnejšie alkaloidy s účinnosťou proti T-lymfoidným bunkám MOLT-4 akútnej lymfoblastickej leukémie (16). Okrem toho inhibuje proliferáciu HeLa buniek, ako aj rast nádorových línií Rauscherovej leukémie, Lewisovho karcinómu pľúc a Ehrlichovho karcinómu (10). Zároveň zvyšuje účinok niektorých cytostatík, napríklad doxorubicínu, najmä u rezistentných foriem myších leukémií. Popísaná je tiež jeho antivírusová aktivita, ktorá bola preukázaná proti vírusom *Herpes simplex* a flavivírusom (16). Jeho praktické využitie je však obmedzené veľmi nízkou dostupnosťou z rastlinných zdrojov (10).



Tazettín



Pretazettín

Obr. 7: Alkaloidy tazettínového štruktúrneho typu.

3.2.2.5. Galantamínový typ

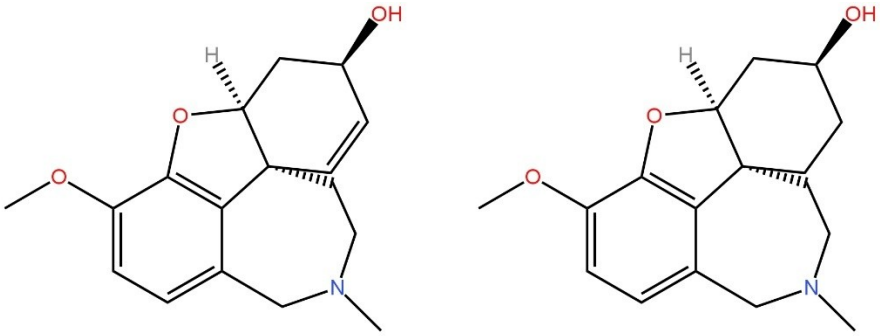
Rastliny z rodu *Narcissus* patria medzi významné zdroje alkaloidov galantamínového typu, pričom najznámejšou zlúčeninou v tejto skupine je galantamín. Tieto alkaloidy sú typické prítomnosťou dibenzofuránového skeletu, ktorý vzniká v dôsledku para-orto′ fenolickej oxidačnej väzby. Na základe výskumov tejto biosyntetickej cesty sa predpokladá, že substrátom pre tvorbu para-orto′ väzby nie je *O*-metylnorbelladín, ale jeho *N*,*O*-dimetylovaný derivát, z ktorého následnými reakciami vzniká galantamín (22).

Medzi alkaloidy galantamínového typu sa zaraďujú látky ako galantamín, lykoramín (Obr. 8), norlykoramín, narwedín, epinorgalantamín a lykoraminon. Z tejto skupiny má najväčší farmakologický význam galantamín (10).

Galantamín bol po prvýkrát izolovaný v 50. rokoch 20. storočia z cibúľ rastliny *Galanthus woronowii* sovietskymi vedcami a neskôr aj z cibúľ ďalších druhov z čeľade Amaryllidaceae (28). Obsah galantamínu v rastlinách rodu *Narcissus* sa mení medzi jednotlivými druhmi a odrodami, pričom koncentrácia sa pohybuje od stopových hodnôt až po 2,5 % (8). Táto látka pôsobí na cholinergný systém dvojitým mechanizmom účinku. Ide o centrálne účinkujúci, selektívny, reverzibilný a kompetitívny inhibítor enzýmu AChE, pričom súčasne pôsobí ako alosterický modulátor nikotínových receptorov pre acetylcholín (28). Týmto spôsobom zvyšuje koncentráciu acetylcholínu v synaptickej štrbine, čím podporuje cholinergný prenos a zmierňuje prejavy kognitívneho deficitu u pacientov s Alzheimerovou chorobou (25). Voči AChE vykazuje približne 50-násobne vyššiu selektivitu v porovnaní s plazmatickou BuChE (28). Alkaloid galantamín je látka, u ktorej neboli zistené žiadne známky cytotoxického účinku (16). Úspech galantamínu podnietil výskum nových inhibítorov AChE (25).

Epi-galantamín, ktorý má hydroxylovú skupinu v α-polohe, a narwedín s keto skupinou na uhlíku C3, sú tiež aktívnymi inhibítormi AChE, avšak ich účinnosť je približne 130-krát nižšia ako u galantamínu. Odstránenie metylovej skupiny na dusíkovom atóme, ako je to u *N*-demetylgalantamínu, spôsobuje pokles aktivity až desaťnásobne. Alkaloid 11β-hydroxygalantamín nesie hydroxylový substituent na pozícii C11 a je taktiež približne desaťkrát menej účinný v porovnaní s galantamínom. Úplnú stratu inhibičnej schopnosti voči AChE spôsobuje hydrogenácia dvojitej väzby medzi uhlíkmi C4 a C4a, čo možno pozorovať pri lykoramíne. Naopak sanguinín, ktorý nesie na uhlíku C9 hydroxylovú skupinu namiesto metoxylovej, vykazuje približne desaťnásobne vyššiu účinnosť než galantamín (25).

Medzi druhy narcisov, u ktorých boli zistené alkaloidy galantamínového štruktúrneho typu, patria *N. poeticus, N. pseudonarcissus, N. jonquila, N. cyclamineus* (10).



Galantamín Lykoramín

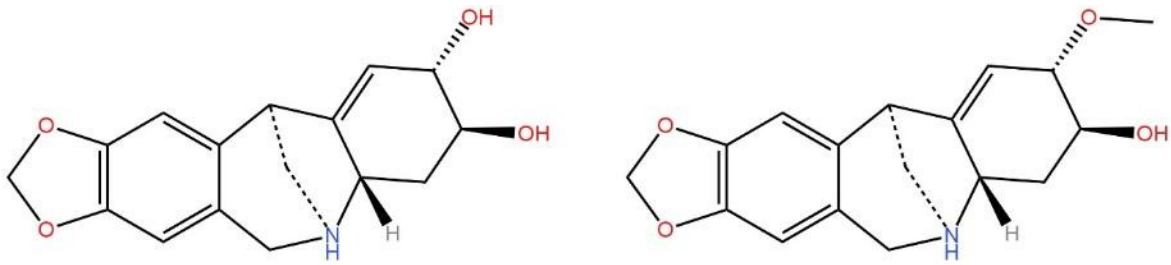
Obr. 8: Alkaloidy galantamínového štruktúrneho typu.

3.2.2.6. Montanínový typ

Alkaloidy tejto skupiny sú odvodené od 5,11-methanomorfantridínového skeletu, ktorý sa vytvára oxidačnou väzbou typu para–para′ medzi fenolovými kruhmi (8).

Montanínové alkaloidy patria medzi štruktúrne typy s malým počtom známych zlúčenín, pričom doteraz bolo identifikovaných štrnásť zástupcov tohto typu. Historicky prvými opísanými alkaloidmi montanínového typu boli montanín (Obr. 9), kokcinín, mantidín a mantín. O niekoľko rokov neskôr bola objavená a popísaná ďalšia zlúčenina tohto typu označená ako pankracín. Pankracín (Obr. 9) sa od ostatných montanínových alkaloidov odlišuje prítomnosťou dvojitej väzby medzi atómami uhlíka C1 a C11a, ako aj dvomi hydroxylovými skupinami na stereocentrách C2 a C3 v E kruhu skeletu (29).

Pankracín preukázal výraznú antibakteriálnu aktivitu voči *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus,* pričom zároveň vykázal slabú účinnosť proti protozoálnym patogénom, ako sú *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Plasmodium falciparum a Trypanosoma cruzi* (8). Okrem antimikrobiálnych vlastností preukázal aj cytotoxickú aktivitu voči viacerým ľudským nádorovým bunkovým líniám *in vitro*. Mechanizmus jeho cytotoxického pôsobenia však doposiaľ nebol detailne preskúmaný a zostáva predmetom ďalšieho farmakologického výskumu (29). V experimentálnych štúdiách montanín vykazoval antidepresívne, anxiolytické a antikonvulzívne účinky u myší. Okrem toho tiež inhibuje aktivitu AChE a má aj cytotoxickú aktivitu (25).



Pankracín Montanín

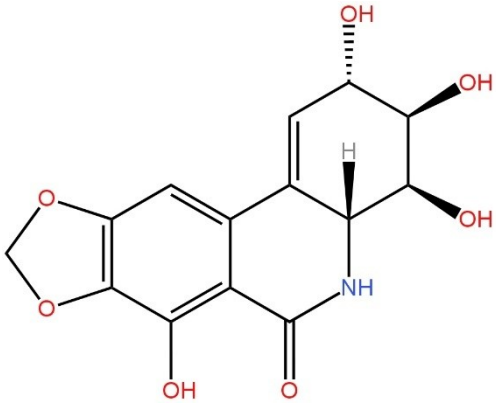
Obr. 9: Alkaloidy montanínového štruktúrneho typu.

3.2.2.7. Pankratistatínový typ

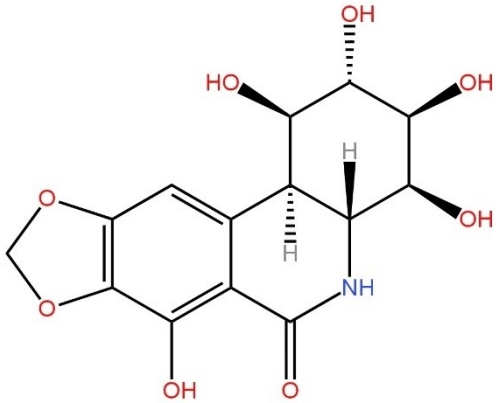
Alkaloidy patriace do tejto skupiny vychádzajú zo štruktúry fenantridínu a medzi ich najvýznamnejších zástupcov patria pankratistatín a narciklasín (Obr. 10) (16).

Narciklasín bol prvýkrát izolovaný v roku 1967 z cibúľ narcisov v rámci výskumu antirastových faktorov, pričom jeho správna chemická štruktúra bola stanovená v roku 1970. Zaujímavosťou je, že táto látka bola nezávisle objavená aj v rastline *Lycoris radiata* pod názvom lykoricidinol (30). Narciklasín má cytotoxickú aktivitu, ktorá spočíva vo viazaní na 60S ribozomálnu podjednotku, kde blokuje peptidyltransferázovú aktivitu a tým bráni tvorbe peptidových väzieb počas syntézy proteínov. Výskumy tiež preukázali, že narciklasín indukuje apoptózu prostredníctvom aktivácie smrtiacich receptorov (death receptor 4 - DR4) v bunkách ľudského karcinómu prostaty a adenokarcinómu prsníka. Narciklasín okrem svojich protinádorových účinkov vykazuje aj antibakteriálne, antifungálne a antivírusové účinky. Konkrétne pôsobí antifungálne proti *Candida albicans,* baktericídne proti baktérii *Corynebacterium fascians* a antivírusovo proti RNA vírusom spôsobujúcim hemoragickú horúčku, medzi ktoré patria flavivírusy a bunyavírusy (16). Ďalšou oblasťou možného využitia narciklasínu sú zápalové ochorenia, keďže tento alkaloid disponuje výraznými protizápalovými vlastnosťami. Navyše *in vitro* výskum ukázal, že narciklasín znižuje hladiny prekurzorov β-amyloidného proteínu, čím následne redukuje jeho produkciu v súvislosti s Alzheimerovou chorobou (30).

Pankratistatín je alkaloid izolovaný z *Hymenocallis littoralis*, ktorý vykazuje cytotoxickú aktivitu voči ľudským nádorovým bunkám. Novšie výskumy potvrdili jeho selektívnu toxicitu na rakovinové bunky, pričom zdravé bunky pri mikromolárnych koncentráciách zostávajú nepoškodené (31). Jeho mechanizmus účinku spočíva v ovplyvňovaní priepustnosti mitochondriálnej steny a v iniciovaní apoptózy v bunkových líniách (18).



Narciklasín

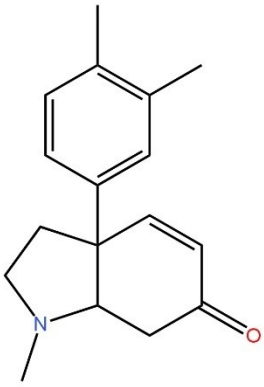


Pankratistatín

Obr. 10: Alkaloidy pankratistatínového štruktúrneho typu.

3.2.2.8. Mesembranový typ

Mesembranový typ alkaloidov predstavuje osobitú skupinu prírodných zlúčenín, ktorých štruktúru tvorí aryloktahydroindolové jadro. Okrem hlavného zástupcu, mesembrínu (Obr. 11), sú do tejto skupiny zaradené aj príbuzné zlúčeniny, ako sú mesembranol, mesembrenol a mesembrenón. Najvýznamnejšie biologické účinky má práve mesembrín, ktorý sa prirodzene vyskytuje predovšetkým u rastlín rodu *Sceletium,* zatiaľ čo v rode *Narcissus* je prítomný len v nízkych koncentráciách alebo vôbec. Mesembrín a mesembrenón sú farmakologicky skúmané pre svoju schopnosť inhibovať spätné vychytávanie serotonínu, pričom mesembrenón navyše vykazuje silný inhibičný účinok na enzým fosfodiesterázu typu 4 (PDE4) (32, 33).



Mesembrín

Obr. 11: Alkaloid mesembranového štruktúrneho typu.

3.3. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) patrí medzi progresívne, ireverzibilné a neurodegeneratívne ochorenie (7). Spôsobuje poruchy pamäte, myslenia až sa prejaví neschopnosť vykonávať každodenné aktivity (34).

Je to najčastejšia forma demencie a predstavuje 60–70 % všetkých demencií (34). Celosvetovo postihuje viac ako 36 miliónov pacientov a v dôsledku starnutia populácie sa tento počet neustále zvyšuje. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) predpokladá, že v roku 2050 bude týmto ochorením trpieť približne 131 miliónov ľudí (7).

Dĺžka života u pacientov s AD je rôzna. Väčšinou od prejavu prvých príznakov sa dožívajú približne 7–10 rokov, avšak sa môžu dožiť i viac ako 15 rokov. U geneticky podmienených foriem so skorým začiatkom úmrtie pacientov môže prísť i do 3 rokov od prejavu prvých príznakov (35).

3.3.1. Klinický obraz

Ochorenie AD vzniká postupne. Väčšinou sa prejavuje vo vyššom veku a preto sa príznaky tohto ochorenia často prisudzujú k prirodzenému starnutiu organizmu. Z tohto dôvodu sa AD v počiatočných štádiách ťažko rozoznáva (36).

V počiatočnom štádiu sa ochorenie prejavuje zhoršením funkcie pamäti a reči. V rámci pamäte sa prejavuje najmä spomaleným myslením a zníženou intelektovou kapacitou. V tomto štádiu sa u pacientov môže vyskytovať aj cefalea, závrate, depresia a nepokoj. Motorické poruchy sa u pacientov objavujú ojedinele (36).

Druhé štádium trvá jeden až tri roky a prejavuje sa najmä poruchami krátkodobej pamäti. U pacientov je zhoršená schopnosť pamätať a učiť sa nové informácie, avšak staršie údaje si pamätajú. Pacient zabúda a stráca predmety. Zabúda slová, čo sa prejavuje aj na plynulosti reči. Zhoršuje sa orientácia, priestorová aj časová. Tieto príznaky si začína všímať okolie, niekedy si to uvedomí aj sám pacient (36).

Nasledujúce štádium sa prejavuje závažnými poruchami pamäte. Pacient má ťažkosti spomenúť si na svoju adresu bydliska, dátum narodenia, mená detí a rozpráva nelogicky. Nakoniec sa prestáva orientovať vo vlastnom byte a je odkázaný na pomoc druhých (36).

V poslednom štádiu dochádza k úplnej strate pamäti, k neschopnosti sa postarať o seba, objavujú sa bludy, agresivita, halucinácie a inkontinencia moču a stolice. Toto štádium prechádza do terminálneho štádia, v ktorom sa prejavujú extrapyramídové príznaky, zvýšený tonus parkinsonského typu a myoklonie (36).

3.3.2. Rizikové faktory

AD je multifaktoriálne ochorenie, ktorého mechanizmus vzniku nie je dodnes úplne objasnený. Bolo však identifikovaných viacero rizikových faktorov zvyšujúcich pravdepodobnosť jej vzniku a urýchľujúcich jej progresiu (37).

Najvýznamnejším rizikovým faktorom je vek. Incidencia ochorenia rastie s vekom, pričom po 85. roku trpí niektorou formou demencie približne tretina populácie. Je dôležité si uvedomiť, že vyšší vek síce zvyšuje riziko vzniku AD, avšak samotné starnutie nie je postačujúcim faktorom na jej rozvoj (38).

AD patrí medzi ochorenia, pri ktorých zohráva genetická predispozícia významnú úlohu. Jedným z najvýznamnejších genetických faktorov je gén pre apolipoproteín E, ktorý sa podieľa na transporte lipidov v krvnom obehu. Osobitnou skupinou s výrazne zvýšeným genetickým rizikom rozvoja AD sú jedinci s Downovým syndrómom. U týchto pacientov je prítomná trizómia 21. chromozómu, na ktorom sa nachádza gén pre amyloidový prekurzorový proteín (APP). Jeho nadmerná expresia vedie k zvýšenej produkcii beta-amyloidových fragmentov, ktoré sa ukladajú v mozgovom tkanive vo forme amyloidových plakov. Dôležitým faktorom rizika vzniku AD je aj rodinná anamnéza. Osoby, ktoré majú rodiča alebo súrodenca s touto diagnózou, majú vyššie riziko jej rozvoja v porovnaní s osobami bez rodinnej záťaže, pričom riziko stúpa s počtom postihnutých príbuzných (38).

Stále viac dôkazov naznačuje prepojenie medzi kardiovaskulárnym zdravím a rizikom rozvoja demencie. Medzi hlavné rizikové faktory, ktoré prispievajú k rozvoju kardiovaskulárnych ochorení a zároveň zvyšujú pravdepodobnosť vzniku demencie, patria vysoký krvný tlak, dyslipidémia, nadváha a cukrovka (39). Výskumy preukázali, že hypertenzia, obezita a zvýšené hladiny cholesterolu v období stredného veku významne zvyšujú riziko demencie v starobe. Zaujímavým zistením je, že obezita vo vyššom veku a hypertenzia, ktoré sa objavia až po osemdesiatke môžu toto riziko paradoxne znižovať (38). Medzi kardiovaskulárne ochorenia, ktoré majú vplyv na riziko vzniku AD, patrí aj srdcové zlyhanie, ktoré podľa niektorých údajov zvyšuje pravdepodobnosť rozvoja AD približne 1,8-násobne. Na druhej strane, užívanie antihypertenzív sa javí ako potenciálne ochranný faktor, ktorý môže spomaliť kognitívny pokles a znížiť pravdepodobnosť rozvoja demencie (39).

Spánkové poruchy, ako je obštrukčná spánková apnoe alebo narušená architektúra spánku, sa spájajú so zvýšeným rizikom kognitívneho poklesu a vznikom AD (39).

Výživa hrá tiež kľúčovú úlohu. Nadmerná konzumácia nasýtených tukov zvyšuje riziko AD, zatiaľ čo mononenasýtené a omega-6 polynenasýtené tuky môžu mať ochranný vplyv.

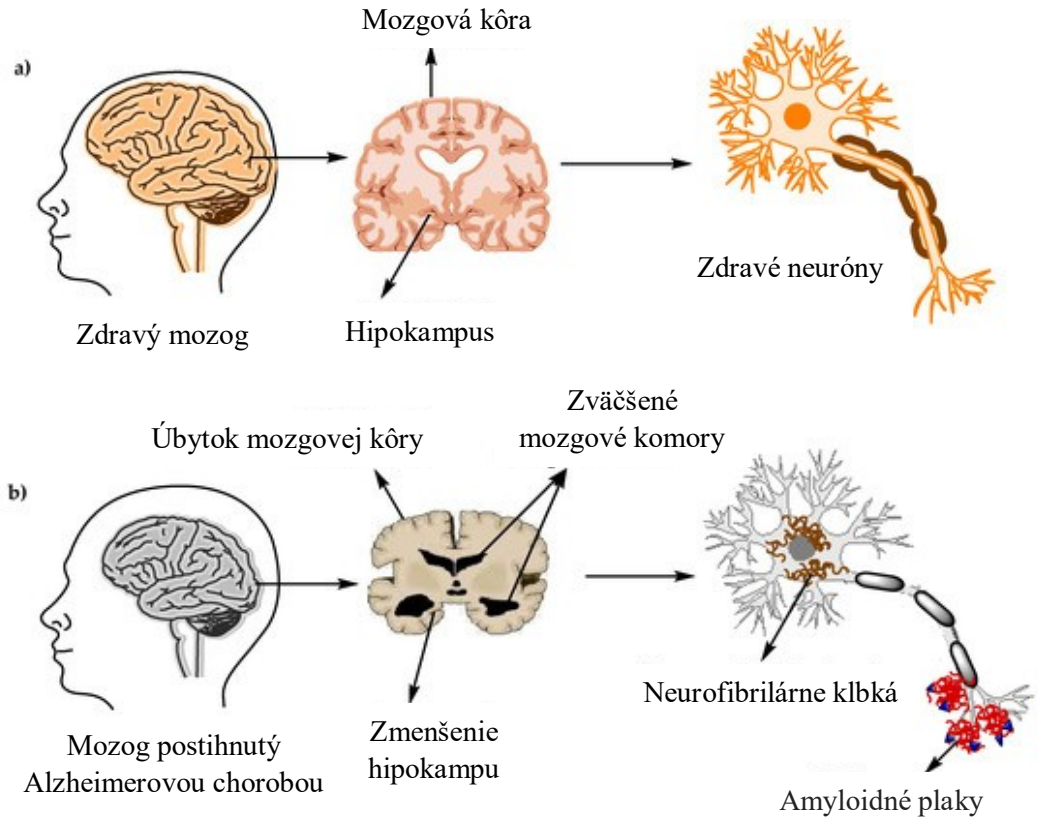
Strava s vysokým podielom sodíka, prekračujúca 12 gramov denne, sa spája s trojnásobne vyššou pravdepodobnosťou výskytu kognitívneho poškodenia. U myší bola preukázaná súvislosť medzi vysokým príjmom soli a poruchou funkcie mozgových ciev, zníženým cerebrálnym prietokom a zhoršením kognitívnych schopností. Naopak, niektoré zložky potravy môžu pôsobiť preventívne. Vitamíny C a E ako antioxidanty môžu chrániť neuróny pred oxidačným poškodením, čím potenciálne znižujú riziko vzniku AD (39). Napriek tomu štúdie výživových doplnkov zatiaľ nepreukázali presvedčivý dôkaz o ich účinnosti pri prevencii kognitívneho úpadku alebo demencie (38).

Životný štýl celkovo výrazne ovplyvňuje zdravie mozgu. Kým fajčenie riziko demencie zvyšuje, pravidelná fyzická aktivita ho naopak znižuje. Nie je síce zatiaľ jednoznačne určené, aký druh alebo objem pohybovej aktivity je najefektívnejší, no všeobecne platí, že aktívny spôsob života má pozitívny dopad na kognitívne funkcie (38).

Traumatické poranenie mozgu spôsobené vonkajšou silou, je spojené so zvýšeným rizikom demencie vrátane AD. Ľudia nad 75 rokov sú najviac postihnutou skupinou, pričom pády sú hlavnou príčinou traumatického poranenia mozgu v tejto vekovej kategórii (38). Experimenty na myšiach naznačujú, že aj mierne úrazy môžu zvýšiť tvorbu amyloidových plakov a spôsobiť kognitívne poruchy (39).

3.3.3. Patogenéza

Patogenéza AD nie je doposiaľ úplne objasnená a v priebehu rokov bolo navrhnutých viacero hypotéz, ktoré sa snažia vysvetliť vznik tohto ochorenia, vrátane β-amyloidnej teórie (Obr. 12), hypotézy τ-proteínu, cholinergnej hypotézy a teórie glutamátovej neurotoxicity, pričom zatiaľ sa nepodarilo vytvoriť jednotnú teóriu, ktorá by plne objasnila komplexnú patogenézu AD (37).



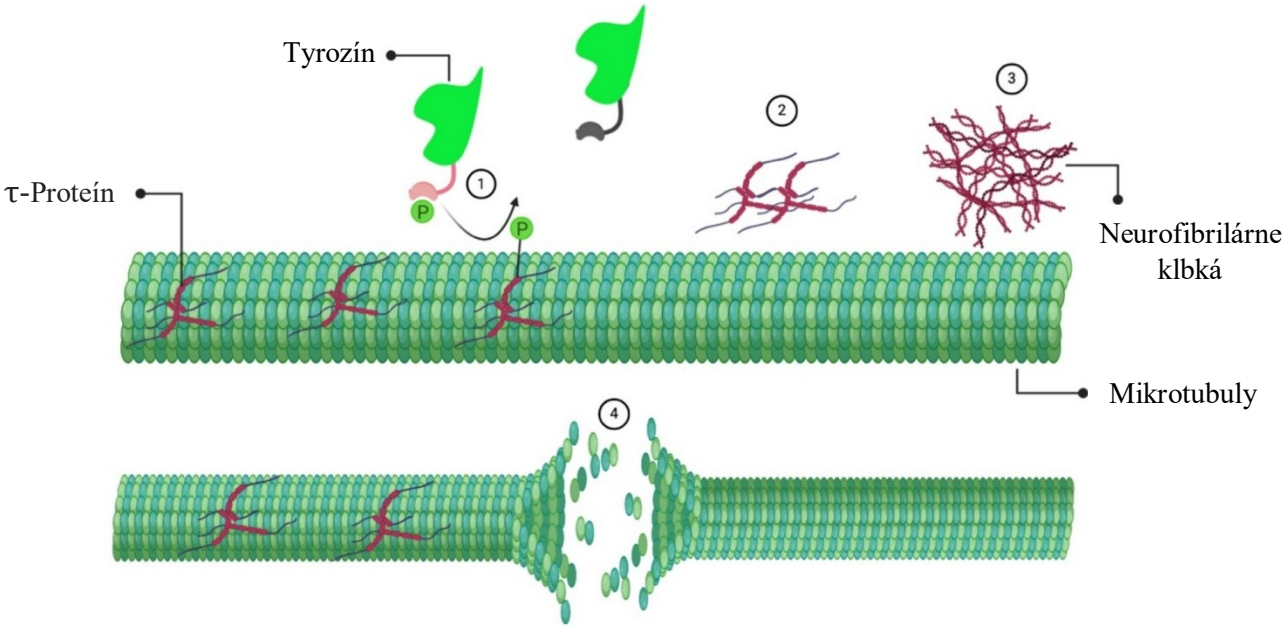
Obr. 12: Štruktúra mozgu a neurónov a) zdravý mozog, b) mozog postihnutý AD (37).

3.3.3.1. β-amyloidná teória

Táto teória hovorí o tom, že vznik AD je spôsobený extracelulárnou akumuláciou a agregáciou β-amyloidu (Aβ) v niektorých častiach mozgu (mozgová kôra, hipokampus, amygdala). Následne tu dochádza k vyššiemu úbytku neurónov, ako pri bežnom starnutí. Amyloid vzniká v dôsledku štiepenia transmembránového amyloidného prekurzorového proteínu (APP) (18, 40). Za fyziologických podmienok je APP štiepený enzýmom α-sekretázou v non-amyloidogénnej ceste, čím vzniká rozpustný fragment sAPPα a membránový fragment C83. Tento fragment (sAPPα) za normálnych podmienok zohráva úlohu pri tvorbe nových neuronálnych synapsií. U AD sa pri štiepení APP uplatňujú enzýmy β-sekretáza a γ-sekretáza, ktoré štiepia APP na dlhšie fragmenty o viac ako 42 aminokyselín, ktoré sa navzájom spájajú a vedú k vzniku neurotoxických oligomérov (18, 35). Následne sa zhlukujú v extracelulárnych priestoroch mozgovej kôry, kde polymeráciou dochádza k vzniku patologického proteínu Aβ, ktorý vytvára základ pre amyloidné plaky. V týchto oblastiach dochádza k neurodegeneratívnym zmenám, k tvorbe zápalu, k aktivácii zápalových cyklooxygenáz, k nadmernému uvoľneniu excitačných aminokyselín a k degradácii τ-proteínu. V dôsledku týchto zmien dochádza k poškodeniu neurónov a následne k ich apoptóze (35).

3.3.3.2. Hypotéza τ-proteínu

Bunky aj neuróny sú tvorené cytoskeletom, ktorý je čiastočne zložený z mikrotubulov. Na ich povrchu sa nachádzajú vysoko rozpustné τ-proteíny, ktoré sa zúčastňujú na polymerizácii a stabilizácii mikrotubulov, čím prispievajú k udržaniu integrity cytoskeletu (40, 41, 42). Ako bolo spomenuté pri amyloidnej hypotéze sa v dôsledku poruchy metabolizmu APP vytvára patologický Aβ, čo prispieva k degenerácii a fosforylácii τ-proteínu (43). Hyperfosforyláciou dochádza k zmene konformácie τ-proteínu, čo spôsobuje jeho zníženú rozpustnosť a afinitu k mikrotubulom (18). Fosforylované τ-proteíny opúšťajú mikrotubuly, následne sa medzi sebou zhlukujú a tvoria neurofibrilárne klbká (Obr. 13). Týmto procesom dochádza k nedostatku τ-proteínov v mikrotubulách, čím strácajú svoju funkciu a môžu spôsobiť aj bunkovú smrť alebo apoptózu (42). Fosforylácia a defosforylácia sú regulované pomocou kináz a fosfatáz, ako napríklad multifunkčný glykogén syntáza kináza 3β, ktorý ovplyvňuje reguláciu bunkového cyklu, diferenciáciu a proliferáciu buniek. Jeho zvýšená aktivita môže viesť k rozvoju diabetu, AD alebo zhubného bujnenia (18). U pacientov s AD je τ-proteín trojnásobne hyperfosforylovaný ako u zdravého jedinca (40).



Obr. 13: Tvorba neurofibrilárnych klbiek (42).

3.3.3.3. Cholinergná hypotéza

V 70. rokoch minulého storočia bol u pacientov s AD zistený cholinergný deficit v mozgu, spôsobený nedostatkom enzýmu cholínacetyltransferázy (ChAT), ktorý je dôležitý pri syntéze acetylcholínu (ACh). Tieto poznania viedli k navrhnutiu cholinergnej hypotézy (37, 44).

ACh hrá dôležitú úlohu v centrálnom nervovom systéme (CNS). Pôsobí ako neurotransmiter, ktorý ovplyvňuje učenie, pamäť, pozornosť, spánok a iné kognitívne funkcie, tiež zasahuje aj do produkcie a sekrécie iných neurotransmiterov (napr. dopamín, glycín) v CNS. Jeho syntéza prebieha v cytoplazme neurónov pomocou enzýmu ChAT z aminokyseliny cholínu a acetyl-koenzýmu A. Následne je transportovaný z cytozolu pomocou vezikulárneho acetylcholínového transportéra do synaptických vezikúl. ACh pôsobí na rôzne receptory v tele. V mozgu významne ovplyvňuje pamäť pomocou muskarínových (M) a nikotínových (N) acetylcholínových receptorov. Tieto receptory sa nachádzajú v celom CNS, ale najmä v thalame, kortexe a hippokampe. ACh sa odbúrava pomocou enzýmov AChE a BuChE na cholín a kyselinu octovú. Funkcia enzýmu BuChE je skôr podporná. (18, 43, 45).

AD je spojená s poruchou metabolizmus ACh na rôznych úrovniach. Dochádza k poklesu ChAT, k zníženiu spätného vychytávania cholínu a k zníženej tvorbe ACh. Hladiny AChE a BuChE sú naopak zvýšené a tým dochádza k rýchlejšej degradácii ACh. Z tohto vyplýva, že pacienti trpiaci AD majú zníženú hladinu ACh, čo vedie k poklesu kognitívnych funkcií, pretože dochádza k zhoršeniu nervového prenosu a nakoniec aj k strate cholinergných neurónov. Táto hypotéza tiež hovorí, že znížená hladina ACh nesúvisí len s poruchou mozgových funkcií, ale podieľa sa aj na chybnom spracovaní APP, ktorý spôsobuje tvorbu Aβ a senilných plakov (10, 18).

3.3.3.4. Teória glutamátovej neurotoxicity

Glutamát je hlavný excitačný neurotransmiter centrálneho nervového systému. Receptory pre excitačné aminokyseliny sa delia na ionotropné a metabotropné. Ionotropné receptory, medzi ktoré patria NMDA, AMPA a kainátové receptory, umožňujú rýchly synaptický prenos prostredníctvom iontových kanálov. Metabotropné receptory sú spojené s G-proteínmi (46).

V súvislosti s AD sa pôvodne predpokladalo, že v dôsledku dystrofie neurónov a straty synapsií v neskorých štádiách ochorenia dochádza k poklesu neuronálnej aktivity. Neskoršie

štúdie na myších modeloch však preukázali prítomnosť neuronálnej hyperaktivity vo viacerých oblastiach mozgu. Tento jav je spojený s kumuláciou glutamátu v extracelulárnom priestore, ku ktorej dochádza v dôsledku narušenej funkcie glutamátových transportérov. Porucha spätného vychytávania glutamátu vedie k jeho hromadeniu a následnej nadmernej excitačnej stimulácii neurónov. K zvýšenej koncentrácii glutamátu môžu prispievať aj ďalšie faktory, napríklad abnormálne uvoľňovanie glutamátu z presynaptických zakončení. Výsledkom je narušenie rovnováhy medzi excitačnými a inhibičnými signálmi v mozgu, čo vedie k pretrvávajúcej hyperaktivite a urýchleniu progresie neurodegenerácie (47).

Nadbytok glutamátu a pretrvávajúca aktivácia glutamátových receptorov môžu spôsobiť excitotoxicitu, čo je proces vedúci k poškodeniu a smrti neurónov. Excitotoxicita súvisí predovšetkým s NMDA receptormi, ktorých nadmerná aktivácia vedie k zvýšenému prieniku vápnika (Ca^{2+}) do bunky. To spúšťa kaskádu degradačných procesov, vrátane aktivácie katabolických enzýmov, depolarizácie mitochondriálnych membrán a tvorby voľných radikálov. Tento mechanizmus je prepojený s oxidačným stresom, ktorý vzniká pri nadmernej produkcii reaktívnych foriem kyslíka a dusíka. Tieto radikály poškodzujú lipidy, proteíny, nukleové kyseliny a mitochondrie, čo môže ďalej zvyšovať produkciu reaktívnych foriem kyslíka. Narušenie rovnováhy medzi tvorbou voľných radikálov a antioxidačnými mechanizmami prispieva k úmrtiu neurónov pri neurodegeneratívnych ochoreniach (48).

3.3.4. Diagnostika

Diagnostika AD si vyžaduje komplexný prístup s využitím rôznych typov vyšetrení. U pacienta s podozrením na toto ochorenie sa vykonáva neurologické vyšetrenie, magnetická rezonancia mozgu, biochemické krvné testy vrátane stanovenia hladiny vitamínu B12 a posudzuje sa osobná i rodinná anamnéza. Deficit vitamínu B12 je spájaný s výskytom neurologických porúch a zvýšeným rizikom rozvoja AD. Zvýšené koncentrácie homocysteínu predstavujú rizikový faktor, pretože môžu viesť k oxidačnému poškodeniu buniek, nadmernému vstupu iónov vápnika do neurónov a následne k ich apoptóze (37).

Základom laboratórnej diagnostiky by mala byť predovšetkým detekcia patologických zmien typických pre AD alebo identifikácia markerov, ktorých expresia sa mení už v počiatočných štádiách ochorenia. Ideálny marker by mal byť ľahko dostupný, neinvazívny a zároveň schopný detegovať ochorenie ešte pred objavením sa prvých klinických príznakov. Okrem toho, by mal taktiež poskytovať možnosť sledovať vývoj ochorenia v čase, posudzovať efektivitu zvolenej liečby a pomáhať pri rozlíšení AD od iných druhov demencií. Komplikáciou

v diagnostike však zostáva dlhé trvanie predklinického štádia, ktoré môže prebiehať roky bez akýchkoľvek viditeľných príznakov. Z hľadiska konkrétnych biomarkerov sa meranie hyperfosforylovaného τ-proteínu ukázalo ako účinný nástroj na odlíšenie AD od iných typov demencií. V snahe dosiahnuť včasnejšiu a presnejšiu diagnostiku boli vyvinuté diagnostické kritériá, ktoré kombinujú biochemické testy, zobrazovacie metódy a neuropsychologické hodnotenie pacienta. Biochemická a zobrazovacia diagnostika sa zameriava najmä na typické znaky AD, ako sú β-amyloidové plaky a neurofibrilárne spletence τ-proteínu. Boli identifikované molekuly schopné preniknúť cez hematoencefalickú bariéru a naviazať sa na tieto patologické štruktúry, čo umožňuje ich zobrazenie v ľudskom mozgu (49).

Kognitívne testovanie predstavuje ďalšiu dôležitú súčasť diagnostiky pri podozrení na AD. Jedným z najčastejšie používaných nástrojov je Mini-Mental State Examination (MMSE), no jeho spoľahlivosť nemusí byť v každom prípade dostatočná. Ako doplnkový nástroj sa často využíva test kreslenia hodín (Clock-Drawing Test), ktorý vykazuje vyššiu špecificitu, no takisto nedosahuje úplnú diagnostickú presnosť. Na podrobnejšie zhodnotenie kognitívnych funkcií sa využívajú komplexnejšie neuropsychologické nástroje ako ADAS-Cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive Subscale), ktorý umožňuje detailne posúdiť viaceré oblasti kognitívneho fungovania vrátane pamäti a reči. Vďaka tomu poskytuje presnejší obraz o miere a rozsahu kognitívneho postihnutia. Ďalším dôležitým diagnostickým kritériom je aj typický klinický priebeh ochorenia (35, 50).

3.3.5. Liečba

Aj napriek intenzívnemu výskumu a snahám o vývoj nových liečiv je súčasná liečba AD zameraná predovšetkým na zmiernenie príznakov ochorenia. Jej cieľom je spomaliť zhoršovanie kognitívnych funkcií a zlepšiť kvalitu života pacientov (51).

3.3.5.1. Farmakologická liečba

Farmakoterapia AD v súčasnosti zahŕňa najmä dve hlavné skupiny liekov, inhibítory cholínesterázy a antagonisty NMDA receptorov (37). Hoci liečivá z týchto skupín môžu dočasne zlepšiť alebo aspoň stabilizovať kognitívne funkcie, ich účinnosť zostáva obmedzená. Jedným z faktorov, ktoré znižujú ich účinnosť, je znížená priepustnosť hematoencefalickej bariéry, ktorá sťažuje prienik účinnej látky do mozgu. Tento problém často vedie k potrebe podávania vyšších dávok, čo zároveň zvyšuje riziko výskytu nežiaducich účinkov. Ďalším limitujúcim faktorom je neskoré nasadenie liečby, veľakrát až v pokročilých štádiách

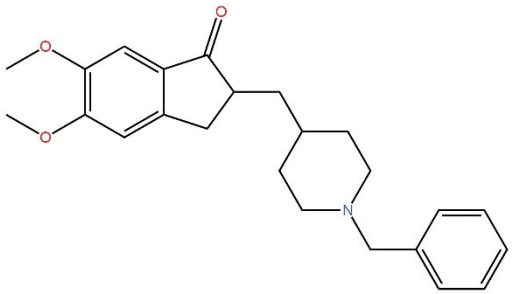
ochorenia, kedy už je prítomné rozsiahle neurodegeneratívne poškodenie. Z tohto dôvodu sa čoraz väčší dôraz kladie na skorý terapeutický zásah, ideálne ešte pred nástupom klinických príznakov, v asymptomatickom štádiu AD (51).

Inhibítory cholínesteráz

Cieľom tejto skupiny liečiv je zvýšiť koncentráciu neurotransmiteru ACh v centrálnom nervovom systéme, keďže u pacientov s AD je jeho hladina výrazne znížená. Mechanizmus účinku spočíva v inhibícii enzýmu AChE, prípadne aj BuChE, čím sa spomaľuje degradácia ACh a zvyšuje sa jeho dostupnosť na cholinergných synapsiách. Tento prístup vychádza z cholinergnej hypotézy AD, ktorá predpokladá, že pokles aktivity cholinergného systému významne prispieva k rozvoju kognitívneho deficitu (37).

Prvým predstaviteľom tejto skupiny bol takrín (tetrahydroaminoakridín), ktorý síce získal schválenie od FDA (Food and Drug Administration), no pre vysoký výskyt nežiaducich účinkov, najmä hepatotoxicitu, bol stiahnutý z klinickej praxe. Následne boli zavedené účinnejšie a bezpečnejšie inhibítory cholínesterázy ako donepezil, rivastigmín a galantamín.

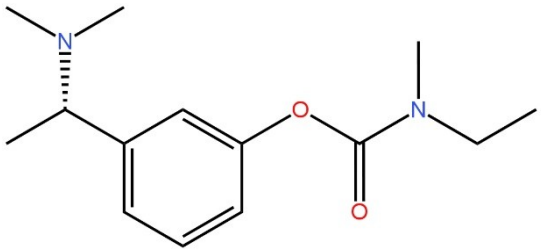
Donepezil (Obr. 14) je považovaný za kľúčový liek v liečbe AD. Vo všeobecnosti je dobre tolerovaný, pričom nežiaduce účinky sa najčastejšie týkajú gastrointestinálneho a nervového systému (37).



Obr. 14: Štruktúra donepezilu.

Rivastigmín (Obr. 15) v terapii AD sa využíva predovšetkým pri miernych až stredne závažných formách ochorenia, kde napomáha k zlepšeniu kognitívnych funkcií a schopnosti zvládať bežné denné činnosti. Perorálne užívanie rivastigmínu môže byť spojené s výskytom nežiaducich účinkov, ako sú nevoľnosť, slabosť, vracanie, tráviace ťažkosti, nechutenstvo alebo úbytok hmotnosti. Tieto príznaky môžu viesť k prerušeniu liečby, avšak pri dlhodobom podávaní často ustupujú a tolerancia k lieku sa zlepšuje. Ako vhodná alternatíva k perorálnemu podaniu sú transdermálne náplasti, ktoré zabezpečujú rovnomerné a kontinuálne vstrebávanie

účinnej látky cez kožnú bariéru. Tento spôsob podania je spojený s nižším výskytom nežiaducich účinkov a lepšou znášanlivosťou, čo vedie k vyššej adherencii pacientov a spokojnosti ich opatrovateľov (37).



Obr. 15: Štruktúra rivastigmínu.

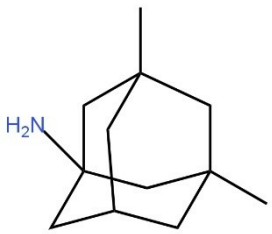
Galantamín je izochinolínový alkaloid, ktorý sa vyznačuje dvojitým mechanizmom účinku. Pôsobí ako kompetitívny inhibítor AChE a zároveň sa alostericky viaže na α-podjednotku nikotínových acetylcholínových receptorov, čím podporuje ich aktiváciu. Galantamín má schopnosť priaznivo ovplyvniť kognitívne schopnosti a každodenné funkcie, pričom vykazuje porovnateľnú účinnosť a znášanlivosť ako ostatné inhibítory AChE. V snahe zlepšiť transport liečiva do mozgu sa v posledných rokoch vyvíjajú rôzne systémy cielenej distribúcie (napr. nanočastice tuhých lipidov alebo nanoemulgačné systémy) (37).

V Českej republike sú v súčasnosti registrované liečivé prípravky obsahujúce donepezil a rivastigmín, zatiaľ čo lieky s obsahom galantamínu nie sú aktuálne registrované (52).

Antagonisti NMDA receptorov

Okrem inhibítorov cholínesterázy sa v liečbe AD používajú aj cholinergné liečivá, ktoré modulujú aktivitu cholinergných receptorov. Tieto lieky priamo ovplyvňujú muskarínové a nikotínové acetylcholínové receptory (53).

Patrí sem memantín (Obr. 16), ktorý pôsobí ako nekompetitívny antagonista NMDA receptorov, čím zabraňuje nadmernej a patologickej aktivácii glutamátového systému. NMDA receptory hrajú kľúčovú úlohu v patofyziológii AD. Ich nadmerná aktivácia spôsobuje zvýšený prísun intracelulárneho vápnika, čo vedie k excitotoxicite, poškodeniu a smrti nervových buniek, a následne k zhoršeniu kognitívnych funkcií (37). Memantín je určený na liečbu stredne ťažkej až ťažkej AD, pričom sa môže podávať samostatne alebo v kombinácii s inhibítormi cholínesterázy (53).



Obr. 16: Štruktúra memantínu.

Monoklonálne protilátky

Tradičné terapeutické prístupy sa zameriavajú najmä na inhibíciu enzýmu AChE a blokádu receptorov NMDA, pričom ich účinok na spomalenie progresie alebo zvrátenie priebehu ochorenia je obmedzený. Z tohto dôvodu je nevyhnutné vyvíjať liečby, ktoré cielene ovplyvňujú patogenetické mechanizmy AD, predovšetkým akumuláciu Aβ plakov. Ako vhodná terapia sa ukázala liečba pomocou monoklonálnych protilátok. Počiatočné pokusy s protilátkami bapineuzumab a solanezumab, ktoré boli vyvinuté ako potenciálne liečivá AD, nepriniesli v klinických fázach očakávané výsledky. Naproti tomu donanemab dosiahol priaznivé klinické účinky, no bol spojený aj s vyšším výskytom nežiaducich reakcií (54).

V posledných rokoch si osobitnú pozornosť získal lekanemab. Ide o humanizovanú monoklonálnu protilátku triedy IgG1, ktorá sa s vysokou afinitou viaže na protofibrily Aβ peptidu. Lekanemab je humanizovanou verziou myšej protilátky mAb158, ktorá preukázala účinnosť v predklinických modeloch (54). Zároveň ide o prvý monoklonálny prípravok určený na liečbu AD, ktorý získal schválenie FDA, a v súčasnosti je registrovaný aj v Českej republike (52, 54). Predklinické štúdie potvrdili schopnosť lekanemabu prechádzať hematoencefalickou bariérou a cielene sa viazať na Aβ plaky, čím podporuje ich odstraňovanie prostredníctvom imunitného systému. Klinické skúšania fázy I a II priniesli výsledky v podobe zníženia množstva Aβ plakov a zlepšenia kognitívnych funkcií u pacientov v skorých štádiách AD. Tieto pozitívne nálezy sa stali základom pre rozsiahlejšie štúdie fázy III, ktoré hodnotia dlhodobú účinnosť a bezpečnostný profil liečby (54).

Potenciálne terapeutické prístupy

Potenciálna liečba AD zahŕňa farmakologické prístupy zamerané na Aβ s cieľom znížiť jeho produkciu alebo podporiť jeho odstránenie. Inhibítory β- a γ-sekretázy, ktoré znižujú tvorbu Aβ, často spôsobili závažné nežiadúce účinky alebo nezlepšili kognitívne funkcie pacientov. Ako sľubné alternatívy sa skúmajú zosilňovače α-sekretázy, pretože aktivácia tohto

enzýmu znižuje tvorbu Aβ a zároveň zvyšuje produkciu neuroprotektívnej rozpustnej formy APP. Ich klinický vývoj je však stále v počiatočnej fáze (53).

Liečivá zamerané na τ-proteín predstavujú ďalšiu potenciálnu liečbu AD. Tento proteín totiž zabezpečuje stabilitu mikrotubulov v neurónoch, no jeho hyperfosforylácia a akumulácia vedú k neurodegenerácii a tvorbe neurofibrilárnych spletí. Súčasný výskum sa zameriava na rôzne prístupy, ako je inhibícia τ agregácie či použitie protilátok proti τ-proteínu, ktoré by mohli znížiť expresiu jeho patologických foriem. Niekoľko liekov a monoklonálnych protilátok je vo fáze klinických skúšok, avšak doteraz chýbajú dôkazy o ich účinnosti (53).

3.3.5.2. Nefarmakologická liečba

Nefarmakologická terapia zahŕňa zmeny životného štýlu, kognitívne cvičenia a rôzne typy neurostimulácie. Výskumy preukázali, že pravidelná fyzická aktivita priaznivo ovplyvňuje mozgové zdravie a môže spomaliť progresiu AD tým, že zlepšuje mozgové prekrvenie, podporuje vznik nových neurónov a zmierňuje zápalové procesy, ktoré vedú k zníženiu hladiny Aβ. Okrem pohybovej aktivity zohráva dôležitú úlohu aj strava a intelektuálna stimulácia. Kombinované prístupy, ktoré zahŕňajú zdravý životný štýl, kognitívne tréningy a kontrolu kardiovaskulárnych rizík, majú potenciál nielen udržať, ale aj zlepšiť kognitívne schopnosti a pomôcť predchádzať rozvoju AD u starších pacientov (37). V posledných rokoch sa stimulácia mozgu považuje za sľubnú nefarmakologickú liečebnú metódu pri AD. Medzi najvýznamnejšie metódy patria hlboká mozgová stimulácia, stimulácia vagového nervu, transkraniálna magnetická stimulácia a transkraniálna elektrická stimulácia (55).

4. Experimentálna časť

4.1. Použitý materiál

4.1.1. Chemikálie použité pri izolácii a identifikácii alkaloidov

- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice)
- Acetonitril p. a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) (ACN)
- Amoniak 25 % vodný roztok p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (NH_3)
- Cyklohexán p. a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) (CHx)
- Destilovaná voda (Katedra analytickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy) (H_2O)
- Diethylamín p. a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) (DeA)
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- Ethanol 95 % (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- Ethyl-acetát p. a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) (EtOAc)
- Chloroform čistý (Penta a.s., Ing. Petr Švec) ($CHCl_3$)
- Chloroform deuterizovaný pre NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma-Aldrich, Praha) ($CDCl_3$)
- Jodid draselný čistý (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina mravčia LC/MS gradient (VWR International, Francúzsko)
- Kyselina trifluóroctová, ReagentPlus®, 99 % (Sigma-Aldrich, Nemecko) (TFA)
- Kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice)
- Methanol LC/MS gradient (VWR International, Francúzsko) (MeOH)
- Methanol p. a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) (MeOH)
- Toluén p. a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) (To)

4.1.2. Chemikálie a enzýmy použité pri meraní inhibície cholínesteráz

- 5,5‘-Dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina (Sigma-Aldrich, Praha) (DTNB, Ellmanovo činidlo)
- Acetylthiocholín jodid (Sigma-Aldrich, Praha)
- Butyrylthiocholín jodid (Sigma-Aldrich, Praha)
- Dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát p.a. (Penta a.s., Ing. Petr Švec) ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (DMSO)
- Eserín (Sigma-Aldrich, Praha)
- Fosfátový pufer (pH = 7,4), (Sigma-Aldrich, Praha)
- Galantamín (Sigma-Aldrich, Praha)
- Hydrogénfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaH_2PO_4)
- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- Ľudská rekombinantná acetylcholínesteráza (Katedra chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Hradec Králové) (hAChE)
- Ľudská rekombinantná butyrylcholínesteráza (Katedra chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Hradec Králové) (hBuChE)

4.1.3. Mobilné fázy

- **MF 1:** CHx : EtOAc : DeA (30 : 60 : 10)
- **MF 2:** CHx : To : DeA (50 : 45 : 5)
- **MF 3:** CHx : EtOAc : DeA (30 : 65 : 5)
- **MF 4:** EtOAc : MeOH : NH_3 (100 : 3 : 3)
- **MF 5:** CHx : EtOAc : DeA (25 : 65 : 10)
- **MF 6:** To : DeA (90 : 10)
- **MF 7:** EtOAc : To : ACN (11 : 7 : 2)
- **MF 8:** ACN : MeOH : TFA (10 : 40 : 0,1)
- **MF 9:** MeOH : EtOAc : TFA (15 : 35 : 0,1)
- **MF 10:** EtOH : To : ACN : NH_3 (11 : 7 : 2 : 0,1)
- **MF 11:** EtOAc : MeOH : TFA (20 : 20 : 0,1)
- **MF 12:** EtOH : To : ACN : NH_3 (25 : 10 : 5 : 0,1)

4.1.4. Prístroje a software

- GraphPad Prism v. 6.07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)
- Polarimeter P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Nemecko)
- Rotačná vákuová odparka (Laborota 20 Heidolph, Nemecko)
- Spektrometer HRMS-ESI, Waters Synapt G2Si s hybridným analyzátorom quadrupoletime-of-flight (Q-TOF) pripojený na Waters Acquity I-Class UHPLC System (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)

- Spektrometer MS-EI na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertný MSD; EI mód 70 eV; kolóna HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometer Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Ultrazvukový kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Nemecko)
- UV reader Synergy HT (Biotek, USA)

4.1.5. Pomocný materiál

- Analytické TLC dosky Silica gel 60 F254 20 × 20 cm (Merck, Nemecko)
- Analytické TLC dosky Aluminium oxide 60 F254 20 × 20 cm (Merck, Nemecko)
- Bežné laboratórne sklo
- Kremelina Celite C 535 John‘s Manville (Sigma-Aldrich, Praha)
- Silikagél (63–200 μm) (Fluka, USA)
- Silikagél Kieselgel 60 GF_{254} (Merck, Nemecko)
- Sušiace perly silikagélu (Penta a.s., Ing. Petr Švec)
- Vata

4.2. Všeobecné postupy

4.2.1. Príprava liatych dosiek

Komerčný silikagél Kieselgel 60 GF_{254} sa zmieša s destilovanou vodou vo vhodnom pomere za vzniku suspenzie. Na sklenené dosky s rozmermi 15 × 15 cm sa nanáša suspenzia pripravená zmiešaním 6,5 g silikagélu a 18,5 ml destilovanej vody. Pre menšie dosky s rozmermi 4 × 15 cm sa používa suspenzia obsahujúca 1,7 g silikagélu a 7 ml destilovanej vody. Suspenzia sa rovnomerne nanesie a rozotrie na vopred očistené sklenené dosky pomocou ethanolu. Takto pripravené TLC doštičky sa následne sušia pri izbovej teplote (Obr. 17). Počas prípravy je potrebné dodržiavať bezpečnostné opatrenia, medzi ktoré patrí aj použitie respirátora.

Obr. 17: Sušenie liatych dosiek.

4.2.2. Nanášanie a vyvíjanie vzorky

Zmes alkaloidov sa najskôr rozpustila v malom množstve chloroformu a ethanolu v pomere 1 : 1, aby koncentrácia zmesi určenej na nanášanie bola v rozmedzí 5–8 %. Takto pripravená vzorka sa nanášala na chromatografickú dosku pomocou pera v podobe úzkej vodorovnej línie (Obr. 18). Línia nanesenia bola umiestnená 1,5 cm od spodnej hrany a 1 cm od bočných okrajov dosky. Počet použitých TLC dosiek sa stanovil podľa množstva vzorky. Pri liatych doskách by nemala koncentrácia vzorky presiahnuť 3 mg/cm, zatiaľ čo pri komerčných doskách je limit stanovený na 1 mg/cm. Po nanesení vzorky sa dosky nechali voľne vyschnúť na vzduchu, aby sa zabezpečilo odparenie použitých rozpúšťadiel. Následne sa chromatografické dosky vyvíjali v komorách, ktoré sa vopred nasýtili parami mobilnej fázy po dobu 25 minút. Po ukončení chromatografie sa dosky vybrali z chromatografických komôr a nechali sa voľne vyschnúť na vzduchu, prípadne sa sušili pod prúdom teplého vzduchu.

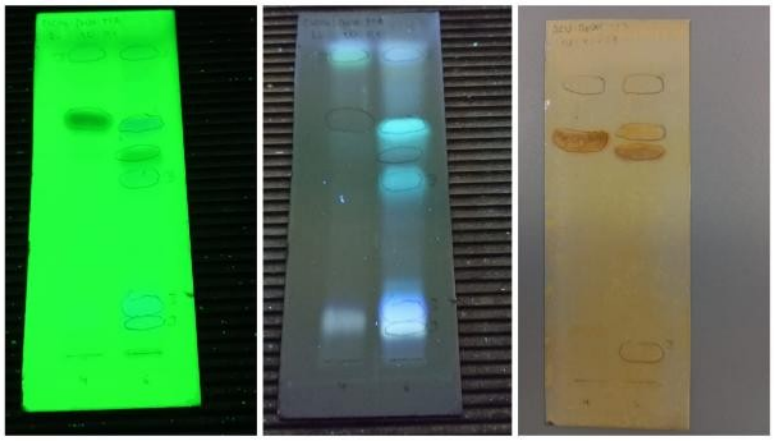
Obr. 18: Nanášanie vzorky na chromatografickú dosku.

4.2.3. Detekcia alkaloidov

Po vysušení TLC doštičky sa identifikovali jednotlivé zóny pomocou UV detekcie a pomocou Dragendorffovho činidla (Obr. 19).

Najskôr sa chromatogramy analyzovali pod UV svetlom pri vlnových dĺžkach 254 nm a 366 nm. Pri 254 nm dosky fluoreskovali v dôsledku prítomnosti fluorescenčnej zložky v silikagéli, zatiaľ čo oblasti, kde sa nachádzali alkaloidy bolo UV žiarenie pohlcované, a preto sa na doske javili ako tmavé škvrny. Pri vlnovej dĺžke 366 nm bolo pozadie dosky tmavé a zlúčeniny sa zobrazovali ako svetlé alebo farebné škvrny. Všetky viditeľné zóny boli označené ceruzkou a následne sa zóny s rovnakým retenčným faktorom zoškriabali a spojili.

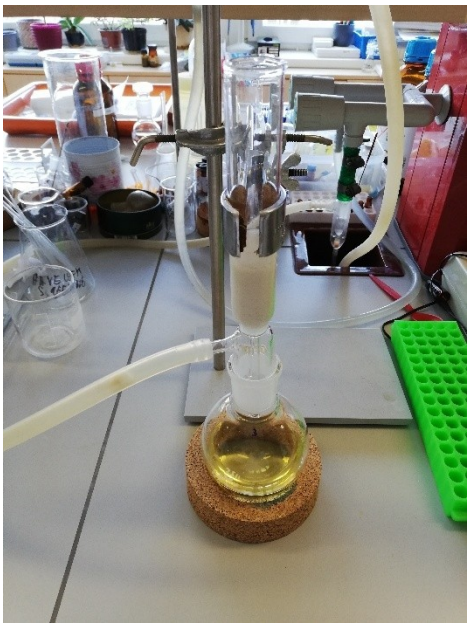
Následne sa uskutočnila detekcia pomocou Dragendorffovho činidla, ktoré s alkaloidmi vytvára charakteristické oranžovočervené až hnedé škvrny. Toto činidlo sa pripravilo zo zásobného roztoku, ktorý vznikol zmiešaním dvoch roztokov v pomere 1:1. Prvý roztok obsahoval 1,7 g dusičnanu bizmutitého a 20 g kyseliny vínnej, ktoré boli rozpustené v 80 ml destilovanej vody. Druhý roztok bol zložený zo 16 g jodidu draselného rozpusteného v 40 ml destilovanej vody. Zo zásobného roztoku sa následne pripravil detekčný roztok určený na postrek chromatografickej dosky. Tento detekčný roztok sa pripravil zmiešaním 5 ml zásobného roztoku, 10 g kyseliny vínnej a 50 ml destilovanej vody. V prítomnosti alkaloidov sa na doskách objavili intenzívne farebné škvrny, čo umožnilo identifikáciu a lokalizáciu jednotlivých zón. Pripravené roztoky sa uchovávali v chladničke, aby sa zabezpečila ich stabilita.



Obr. 19: Detekcia alkaloidov pomocou UV svetla (254 nm, 366 nm) a Dragendorffovho činidla.

4.2.4. Elúcia

Po vykonaní TLC chromatografie boli zóny s rovnakým retenčným faktorom zo všetkých dosiek mechanicky zoškrabané, spojené a následne zmiešané s kremelinou v pomere 1:1. Takto pripravená zmes bola eluovaná v sklenenej elučnej trubici za zníženého tlaku (Obr. 20). Na elúciu sa použila zmes ethanolu a chloroformu v pomere 1:1. Objem rozpúšťadiel predstavoval približne 15-násobok objemu eluovaného adsorbenta. Po ukončení elúcie sa kolóna ešte premyla 5-násobným objemom čistého ethanolu, aby sa zabezpečilo úplné vymytie všetkých naviazaných látok.



Obr. 20: Elúcia.

4.2.5. Odparovanie

Na odparenie rozpúšťadiel bola použitá vákuová rotačná odparka (Obr. 21). Odparovanie prebiehalo na vodnom kúpeli za zníženého tlaku pri teplote 40–45 °C. Zvyšok sa následne pomocou malého množstva chloroformu a ethanolu kvantitatívne preniesol do sklenených vialiek a odparovanie pokračovalo na vodnom kúpeli. Tento proces bol urýchľovaný prúdom vzduchu.

Obr. 21: Vákuová odparka.

4.2.6. Sušenie a skladovanie

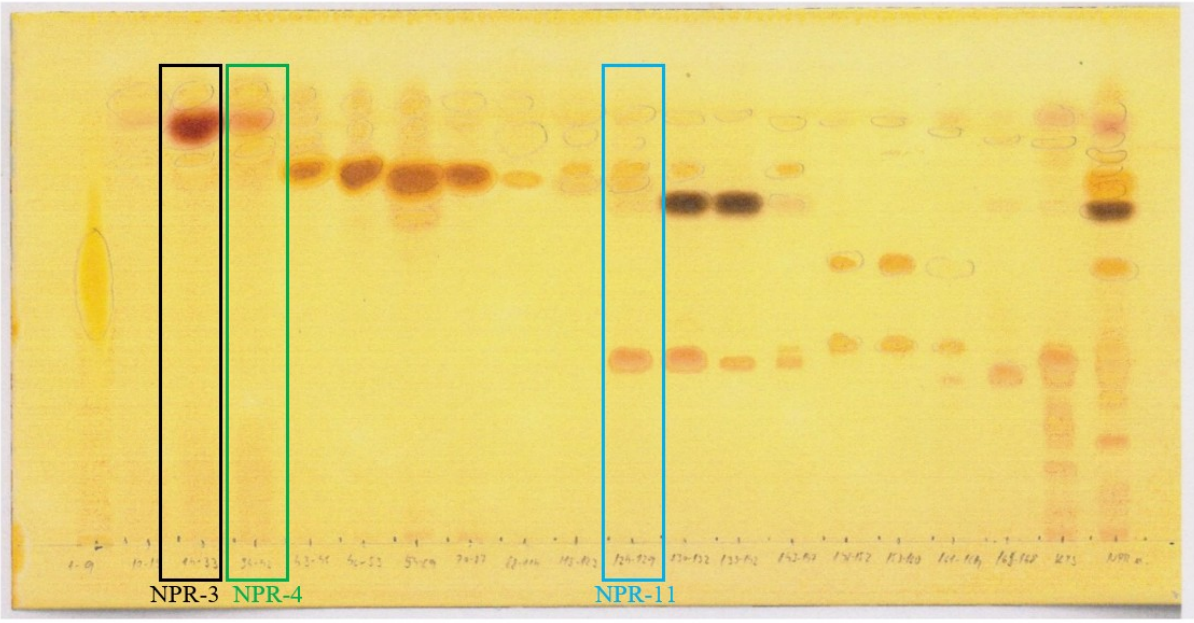
Po odparení rozpúšťadiel boli získané čisté látky a ich zmesi sušené vo vákuovom exikátore za zníženého tlaku po dobu minimálne 24 hodín (Obr. 22). Následne boli vzorky uzatvorené do sklenených nádob a skladované pri teplote 2–8 °C.

Obr. 22: Sušenie v exikátore.

4.3. Získanie alkaloidných frakcií

V tejto diplomovej práci boli spracované frakcie NPR-3, NPR-4 a NPR-11, ktoré boli získané z alkaloidného extraktu cibúľ *Narcissus poeticus* var. *recurvus*. Jeho spracovanie nebolo však predmetom tejto diplomovej práce, ale bolo súčasťou výskumu Mgr. Simony Hašanovej, ktorá dané frakcie z alkaloidného extraktu pripravila v rámci svojej diplomovej práce (56). Pre úplnosť publikácie je nižšie uvedený stručný opis postupu.

Čerstvé cibule (29 kg) boli rozdrvené a trikrát extrahované 96% ethanolom počas 30 minút pod spätným chladičom. Získaný extrakt bol prečistený od balastných a nealkaloidných látok pomocou LLE (liquid-liquid extraction). Extrakt sa okyslil 2% HCl na pH 1–2 a objem suspenzie sa doplnil vodou na 7 l. Po prefiltrovaní sa filtrát odtučnil dietyléterom (3 × 2,8 l), alkalizoval 10 % Na_2CO_3 na pH 9–10 a extrahoval ethylacetátom (3 × 2,5 l). Organická vrstva sa odparila, čím sa získalo 90 g tmavohnedého zvyšku. Vodná fáza sa ďalej extrahovala chloroformom (3 × 1,5 l), čím sa izolovali alkaloidy nerozpustné v ethylacetáte. Po odparení organickej vrstvy sa získalo 15 g alkaloidového extraktu. Keďže extrakty obsahovali nečistoty, celý LLE proces sa zopakoval. Po druhej extrakcii sa získalo 24,96 g alkaloidov z EtOAc a 11,39 g alkaloidov z $CHCl_3$. Po vysušení bezvodým Na_2SO_4, filtrácii a odparení boli oba extrakty porovnané analytickou TLC a GC/MS analýzou. Keďže ich zloženie bolo identické, zlúčili sa do jedného extraktu (36,35 g), na ktorom sa uskutočnili predbežné HPLC/MS a GC/MS analýzy. Alkaloidný extrakt bol následne frakcionovaný pomocou flash chromatografie, ktorou sa získalo 168 frakcií, ktoré sa následne zlúčili do 19 frakcií (Obr. 23). Všetky frakcie boli odparené, odvážené a analyzované pomocou HPLC/MS a GC/MS (56).

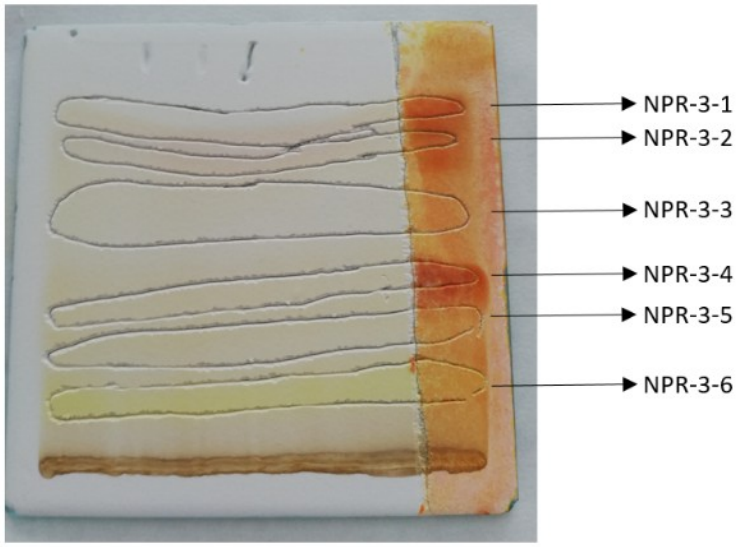


Obr. 23: Frakcie získané z rastliny *Narcissus poeticus* var. *recurvus* s vyznačenými frakciami použitými v tejto práci (56).

4.4. Izolácia alkaloidov

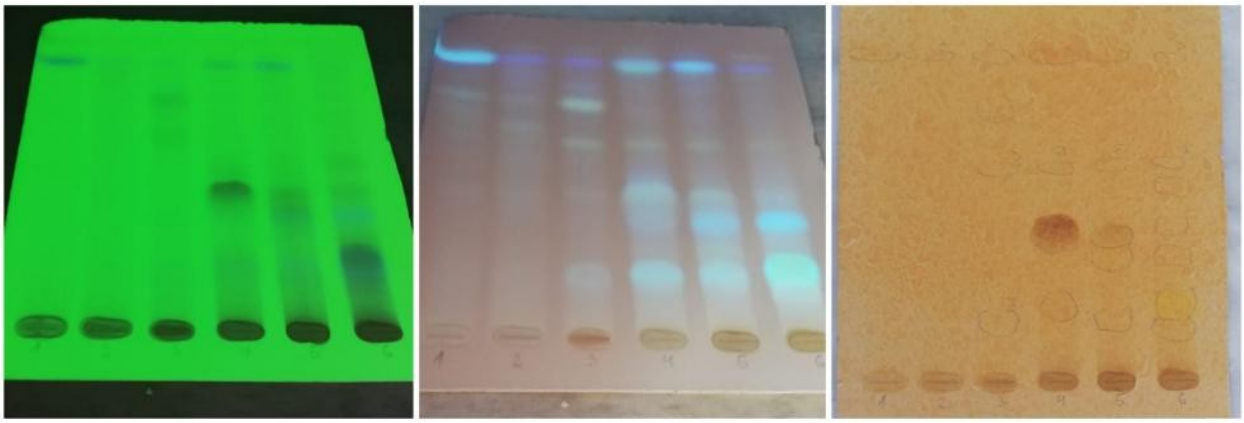
4.4.1. Frakcia NPR-3

Frakcia NPR-3 s hmotnosťou 440 mg bola rozpustená v zmesi chloroformu a ethanolu (1:1) a nanesená pomocou pera na 18 liatych dosiek. Po vyvíjaní v MF 1, vysušení a následnej detekcii sa na doskách objavilo šesť zón, označených ako NPR-3-1 až NPR 3-6 (Obr. 24).



Obr. 24: TLC doštička frakcie NPR-3 s detekciou Dragendorffovým činidlom.

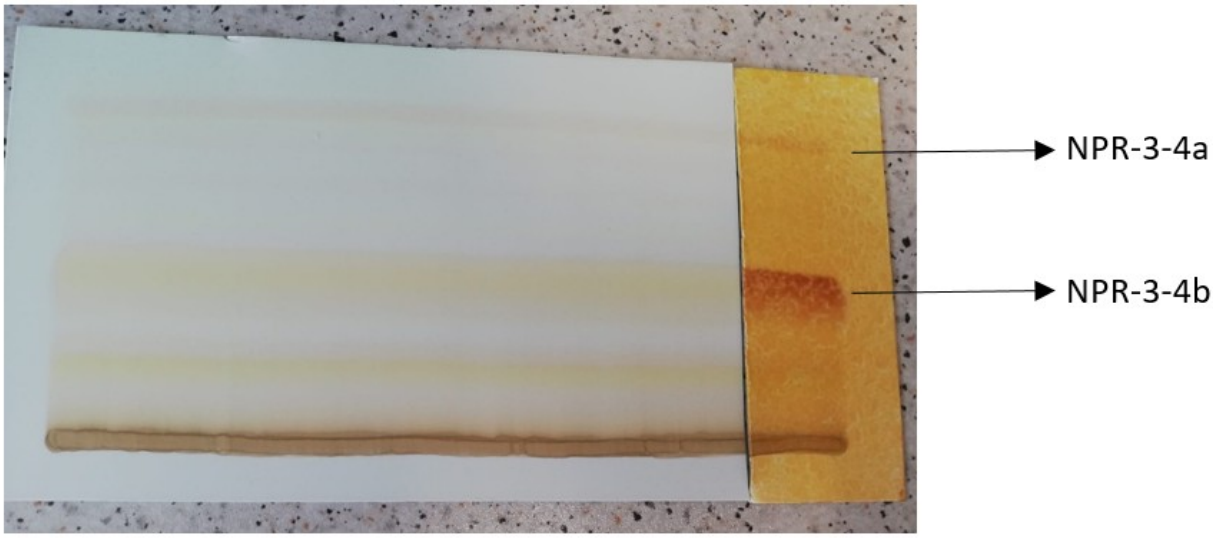
Jednotlivé zóny boli zoškriabané, eluované, vysušené a analyzované pomocou kontrolnej TLC s použitím MF 2 (Obr. 25).



Obr. 25: Kontrolné TLC frakcie NPR-3.

Podfrakcie NPR-3-1 (18,8 mg) , NPR-3-2 (16,7 mg) a NPR-3-3 (8,8 mg) boli skúšané v rôznych mobilných fázach, pričom sa zistilo, že ide o zmesi s vyšším počtom zložiek a zároveň nízkym množstvom materiálu, preto sa v ich ďalšom spracovaní nepokračovalo.

Podfrakcia NPR-3-4 (97,3 mg) bola opätovne prečistená pomocou mobilnej fázy MF 1 na desiatich analytických TLC doštičkách. Po vyvíjaní a vysušení boli po nastriekaní doštičky Dragendorffovým činidlom viditeľné dve zóny, označené ako NPR-3-4a a NPR-3-4b (Obr. 26). Obe zóny boli zoškrabané, eluované a vysušené.



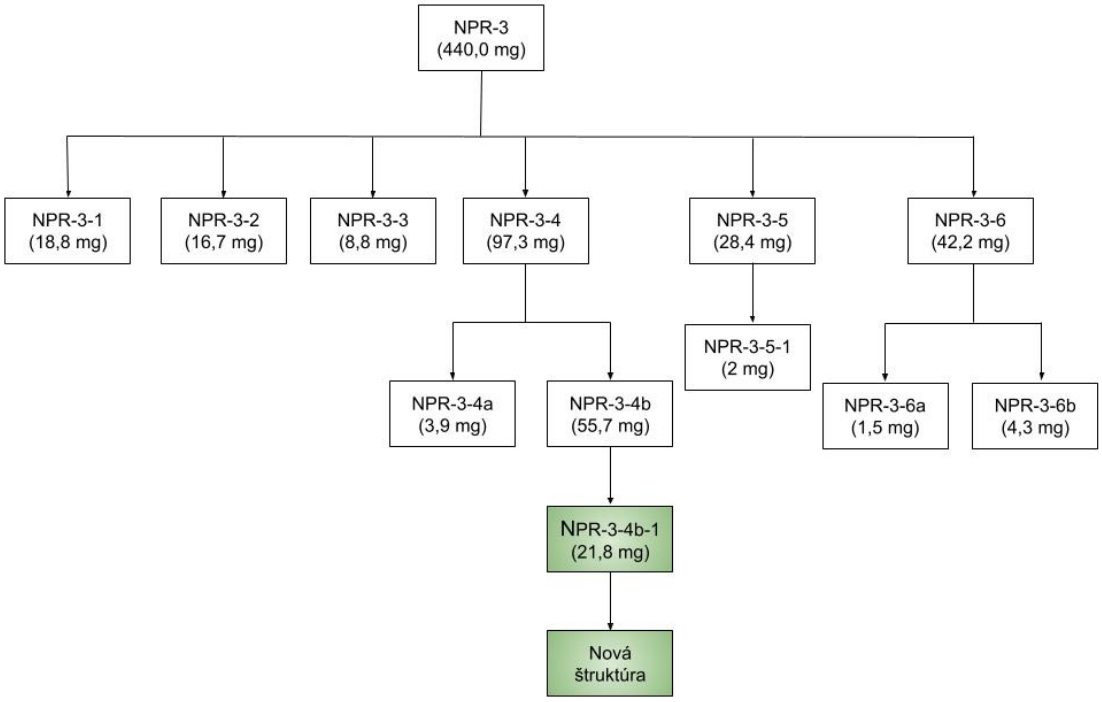
Obr. 26: Čistenie frakcie NPR-3-4 pomocou MF 1.

Zóna NPR-3-4a s výťažkom 3,9 mg bola analyzovaná pomocou HPLC, pričom sa ukázala prítomnosť viacerých látok. Pri kontrolnej TLC sa u zóny NPR-3-4b zistilo, že látka pravdepodobne podlieha rozkladu. Rovnaké správanie bolo pozorované aj pri analýze na TLC doštičkách s oxidom hlinitým. Následne bola látka prečistená pomocou mobilnej fázy MF 3 a uložená do mrazničky za prítomnosti argónu pod označením NPR-3-4b-1 (21,8 mg). Výsledky analýzy NMR udávajú, že ide o doteraz nepopísanú zlúčeninu.

Podfrakcia NPR-3-5 s hmotnosťou 28,4 mg bola prečistená pomocou MF 2, pričom sa získalo 2 mg látky označenej ako NPR-3-5-1. Táto vzorka bola ďalej analyzovaná pomocou GC/MS, ktorá ukázala, že ide o zmes viacerých látok, preto vzhľadom na malé množstvo nebola ďalej spracovaná.

Z podfrakcie NPR-3-6 (42,2 mg) boli pomocou MF 4 získané zóny NPR-3-6a (1,5 mg) a NPR-3-6b (4,3 mg). Analýza GC/MS ukázala, že obe obsahujú niekoľko ďalších látok a vzhľadom na ich nízke množstvo sa ďalej neprečisťovali.

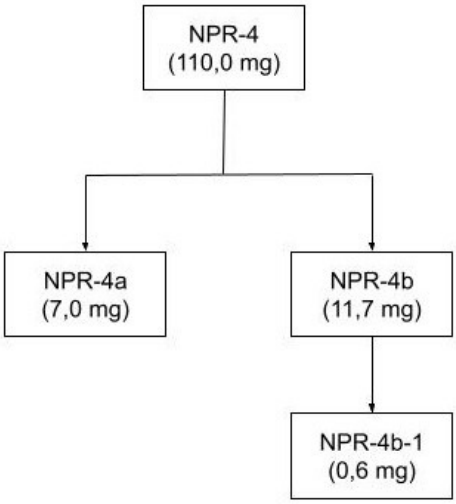
V nasledujúcej schéme sa nachádza prehľadný postup separácie frakcie NPR-3 (Obr. 27)



Obr. 27: Schéma separácie NPR-3.

4.4.2. Frakcia NPR-4

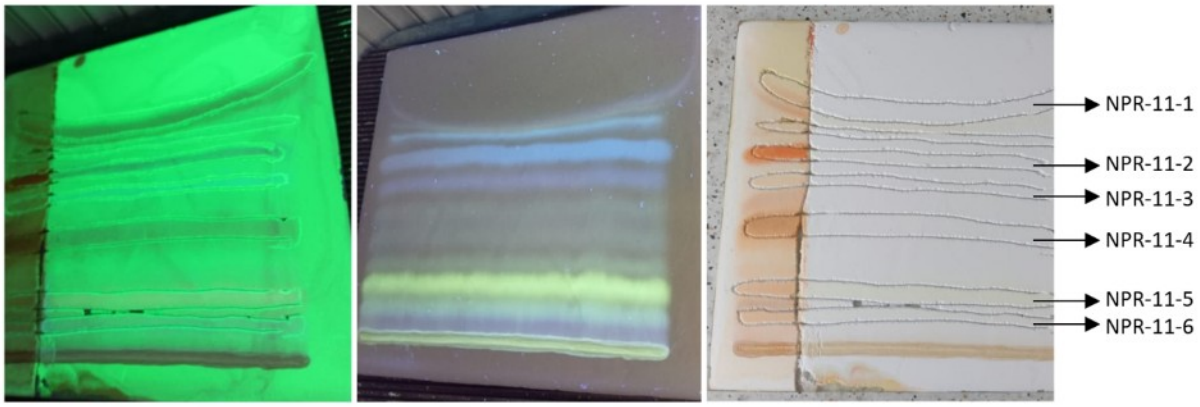
Frakcia NPR-4 (110 mg) bola rozdelená pomocou mobilnej fáze MF 5 na dve zóny, čím vznikli podfrakcie NPR-4a (7 mg) a NPR-4b (11,7 mg). Kontrolná TLC analýza u NPR-4a ukázala prítomnosť viacerých látok, a preto sa v jej ďalšom prečisťovaní vzhľadom na množstvo nepokračovalo. Podfrakcia NPR-4b bola ďalej prečistená pomocou mobilnej fázy MF 2, pričom sa získalo 0,6 mg látky označenej ako NPR-4b-1. Ani v tomto prípade sa však nepodarilo získať čistú látku. Na nasledovnom obrázku je uvedený prehľad separácie frakcie NPR-4 (Obr. 28).



Obr. 28: Schéma separácie NPR-4.

4.4.3. Frakcia NPR-11

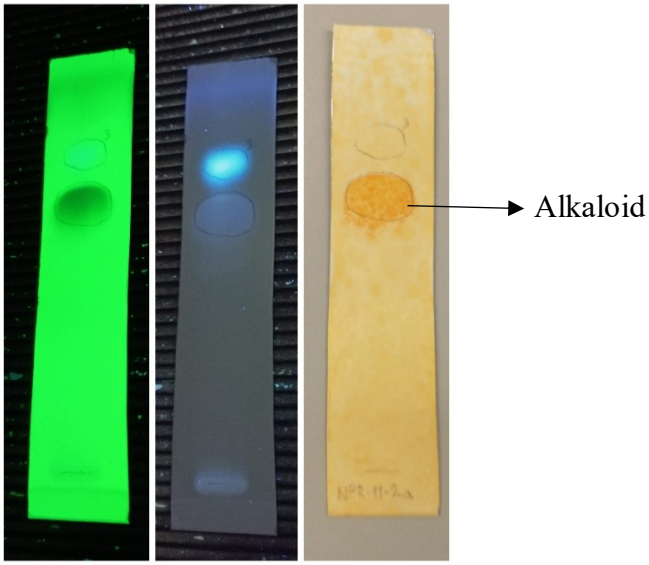
Z pôvodnej hmotnosti frakcie (1,82 g) bolo odobratých 0,9 g, ktoré sa prečistili na tridsiatich liatych doštičkách za použitia MF 6. Po vyvíjaní a vysušení boli zóny identifikované pomocou UV svetla (254 nm a 366 nm) a Dragendorffovým činidlom. Na ďalšie spracovanie bolo vybraných šesť zón, označených ako NPR-11-1 až NPR-11-6 (Obr. 29).



Obr. 29: Liata doštička s frakciou NPR-11 vyvinutá v mobilnej fáze MF 6.

Podfrakcia NPR-11-1 s výťažkom 10,5 mg bola ďalej prečistená pomocou MF 2, pričom sa získali dve zóny: NPR-11-1a (4,25 mg) a NPR-11-1b (4,58 mg). Obe boli analyzované pomocou kontrolnej TLC, ktorá preukázala prítomnosť nečistôt. Zóna NPR-11-1b bola následne ešte prečistená pomocou MF 7, čím sa získala NPR-11-1b-1 (3,43 mg). Ani táto zóna však neobsahovala čistý alkaloid.

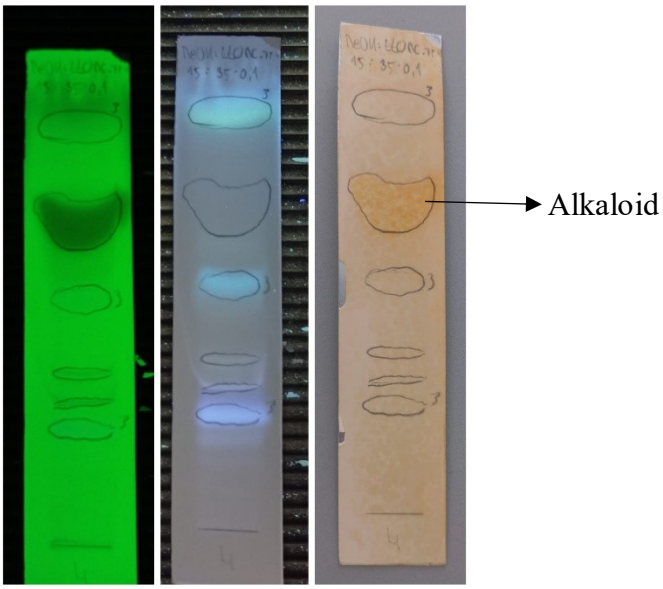
Podfrakcia NPR-11-2 s hmotnosťou 283,7 mg bola opätovne prečistená pomocou mobilnej fázy MF 6, pričom sa získalo 163,7 mg látky označenej ako NPR-11-2a. Po vykonaní kontrolných TLC sa zistila prítomnosť nečistoty (Obr. 30). Z tohto dôvodu bola frakcia ďalej prečistená pomocou MF 8, pričom sa získalo 91,83 mg NPR-11-2a-1. Táto vzorka bola následne analyzovaná pomocou GC/MS, pričom výsledky ukázali zhodu so štruktúrou galantamínu.



Obr. 30: NPR-11-2a –kontrolné TLC.

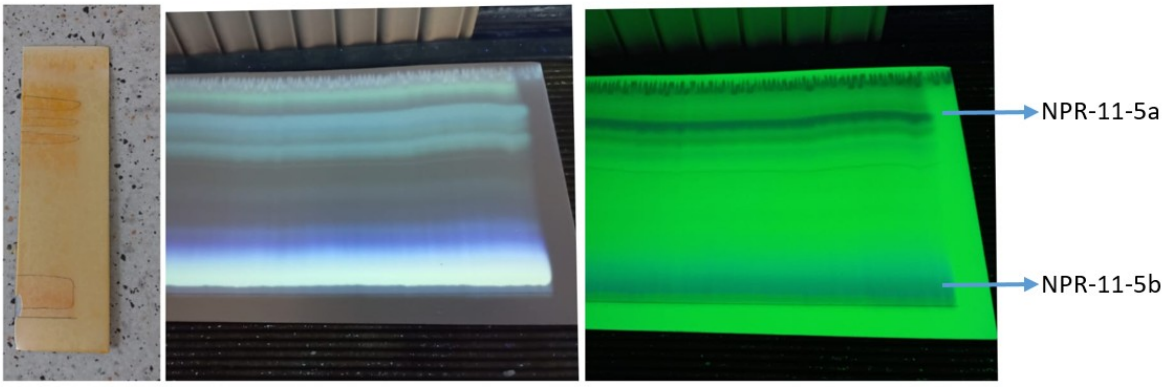
Výťažok podfrakcie NPR-11-3 bol nízky (1,3 mg) a zároveň tu boli prítomné nečistoty, preto sa ďalej spracovával.

Podfrakcia NPR-11-4 s výťažkom 99,3 mg obsahovala nečistoty, preto bola prečistená na jedenástich analytických doštičkách za použitia MF 9 (Obr. 31). Výsledkom bola frakcia NPR-11-4-1 (57,68 mg), ktorá bola testovaná kontrolným TLC, pri ktorých neboli pozorované žiadne nečistoty. Následne bola vzorka analyzovaná pomocou GC/MS, avšak látka nebola dostatočne prchavá pre GC/MS. Výsledky z NMR následne ukázali, že sa jedná o zatiaľ nepopísanú zlúčeninu.



Obr. 31: TLC doštička podfrakcie NPR-11-4 vyvinutá v MF 9.

Podfrakcia NPR-11-5 (42,8 mg) bola prečistená na štyroch analytických doskách pomocou MF 10 (Obr. 32). Týmto postupom sa získali dve zóny: NPR-11-5a (7,34 mg), ktorej štruktúra po GC/MS analýze zodpovedala lykorínu, a NPR-11-5b (3,48 mg), ktorá obsahovala prítomnosť nečistôt a nebola ďalej spracovaná.



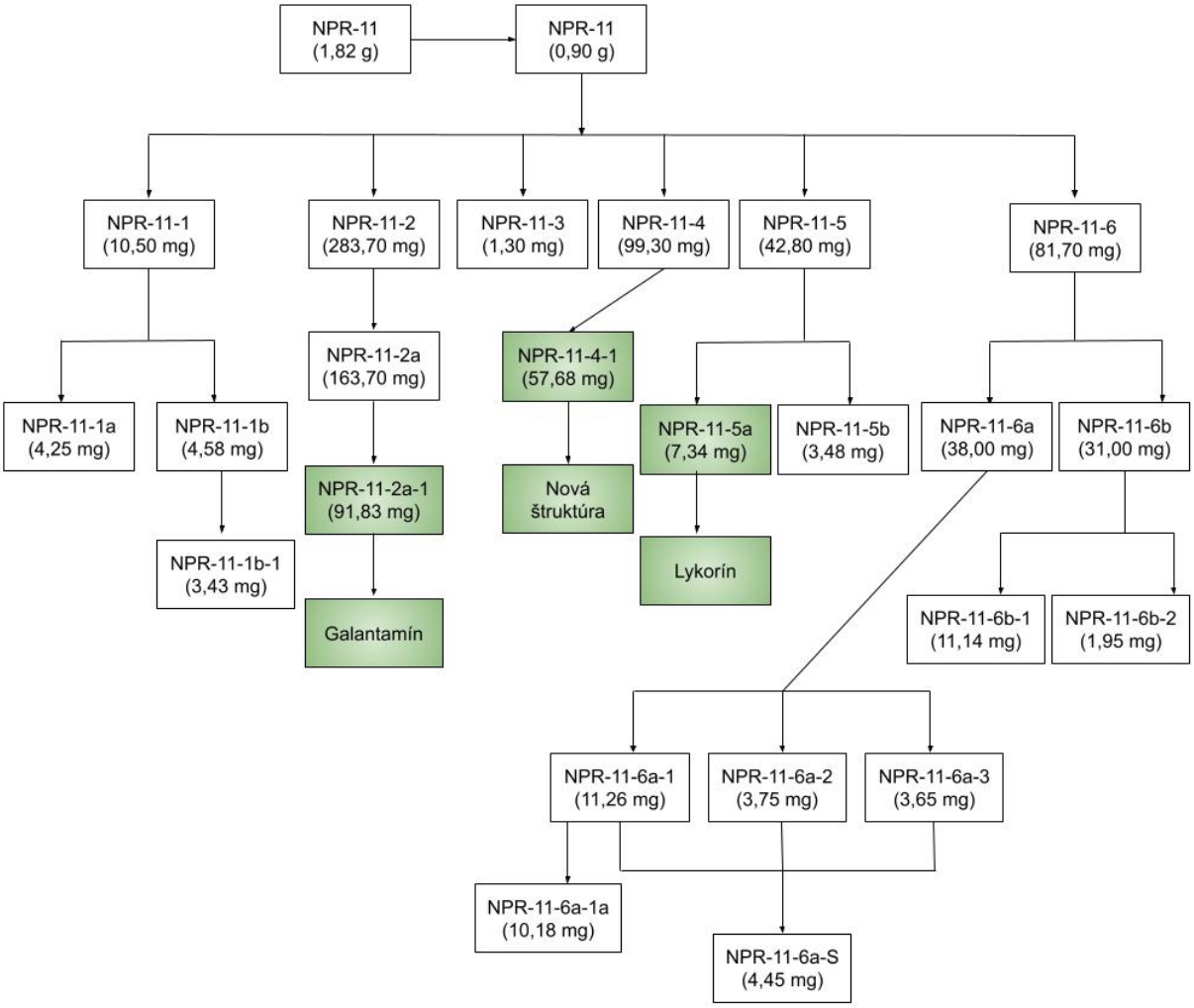
Obr. 32: TLC analýza podfrakcie NPR-11-5 v MF 10.

Podfrakcia NPR-11-6 (81,7 mg) bola prečistená pomocou MF 11, pričom sa získali zóny: NPR-11-6a (38 mg) a NPR-11-6b (31 mg).

Následne bola NPR-11-6a prečistená pomocou MF 8, pričom sa získali tri zóny s nasledovnými výťažkami: NPR-11-6a-1 (11,26 mg), NPR-11-6a-2 (3,75 mg) a NPR-11-6a-3 (3,65 mg). Na základe kontrolných TLC sa zistilo, že ide pravdepodobne o rovnakú látku vo všetkých troch vzorkách, a preto boli tieto zóny opätovne spojené a prečistené pomocou MF 12. Týmto spôsobom sa získala frakcia NPR-11-6a-S s výťažkom 4,45 mg. Ešte predtým však bola vo frakcii NPR-11-6a-1 identifikovaná ďalšia zóna s odlišným retenčným faktorom, ktorá bola pred spojením izolovaná rovnakou mobilnou fázou (MF 12), čím vznikla frakcia NPR-11-6a-1a s výťažkom 10,18 mg. Obe vzorky (NPR-11-6a-S a NPR-11-6a-1a) boli následne analyzované pomocou GC/MS, ktorá ale ukázala prítomnosť nečistôt a vzhľadom k malému množstvu sa vzorky ďalej nespracovávali.

U NPR-11-6b sa pri kontrolných TLC objavili dve zóny, ktoré boli následne prečistené pomocou MF 10. Označili sa ako NPR-11-6b-1 s výťažkom 11,14 mg, ktorá podľa výsledkov GC/MS obsahovala nečistoty, a NPR-11-6b-2 s výťažkom 1,95 mg, ktorá nebola dostatočne prchavá pre GC/MS analýzu.

Pre lepšiu ilustráciu izolácie alkaloidov z frakcie NPR-11 je na Obr. 33 uvedená detailná schéma.



Obr. 33: Schéma separácie NPR-11.

4.5. Metódy použité na identifikáciu izolovaných alkaloidov

4.5.1. Analýza GC/MS-EI

Malé množstvo vzorky (0,2–0,3 mg) bolo rozpustené v 1 ml methanolu čistoty LC/MS a analyzované pomocou plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A spojeného s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 5975C. Na separáciu bola použitá kolóna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies, USA). Na kolónu sa aplikoval 1 µl skúmanej vzorky so splitom 1:10 pri teplote 280 °C. Ako nosný plyn bolo použité He s prietokovou rýchlosťou 0,8 ml/min. Teplotný program bol nastavený nasledovne: 0 min 100

°C, 1 min 180 °C, 15 min 300 °C. Na detekciu sa použil hmotnostný spektrometer s elektrónovou ionizáciou (EI) pri 70 eV. Získané spektrá jednotlivých zlúčenín boli porovnané s údajmi z knižnice spektier NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA).

4.5.2. Analýza NMR

Vzorky o hmotnosti 5–10 mg boli rozpustené v deuterovanom chloroforme ($CDCl_3$) a ich NMR spektrá sa merali na spektrometri VNMR S500 pri laboratórnej teplote 25 °C. Prístroj pracoval s frekvenciou magnetického poľa 499,87 MHz pre jadrá ^1H a 125,70 MHz pre jadrá ^{13}C. Na ožarovanie a detekciu signálu sa použila sonda OneNMR, ktorá je širokopásmovou dvojkanálovou gradientnou sondou s možnosťou regulácie teploty. Chemické posuny boli merané v jednotkách ppm (pars per million) a nepriamo vzťahované k štandardu TMS (tetrametylsilán) pomocou zvyškového signálu rozpúšťadla. Pre rozpúšťadlo $CDCl_3$ boli ako referenčné hodnoty použité $\delta = 7{,}26$ ppm pre ^1H a $\delta = 77{,}0$ ppm pre ^{13}C. Údaje získané z merania sú uvádzané v poradí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita signálu, typ multiplicity (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletu, m: multiplet, bs: široký singlet) a hodnota spojovacej konštanty J (v Hz).

4.5.3. HRMS analýza

Vzorky (0,2–0,5 mg) boli pred meraním rozpustené v acetonitrile a analyzované metódou hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením a ionizáciou elektrosprejom (HRMS-ESI). Merania boli vykonané na systéme Waters Acquity I-Class UHPLC (Waters Corporation, Milford, USA) pripojenom k hybridnému hmotnostnému spektrometru Waters Synapt G2Si Q-TOF (Waters, Manchester, UK), ktorý kombinuje kvadrupólový analyzátor s analyzátorom doby letu (TOF). Chromatografia prebiehala na kolóne Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) pomocou gradientovej elúcie acetonitrilom a 0,1 % kyselinou mravčou s prietokom 0,4 ml/min. Ionizácia elektrosprejom bola vykonaná v pozitívnom móde a spektrá sa zaznamenávali v rozsahu 200–1200 *m/z*. Ako hmotnostný štandard bol použitý leucín-enkefalín a ako kalibrátor sodná soľ kyseliny mravčej. Namerané pomery hmotnosti a náboja (*m/z*) iónov boli porovnané s teoretickými hodnotami. V ideálnom prípade sa tieto hodnoty zhodovali aspoň do druhého desatinného miesta. Táto metóda bola využívaná najmä na určenie presnej molekulovej hmotnosti a štruktúrnu identifikáciu zlúčenín, ktoré doposiaľ neboli v literatúre popísané.

4.5.4. Optická otáčavosť

Optická otáčavosť je fyzikálna vlastnosť typická pre chirálne zlúčeniny, ktoré sa vyskytujú vo forme enantiomérov. Prejavuje sa schopnosťou stáčať rovinu polarizovaného svetla, pričom pravotočivé zlúčeniny sa označujú symbolom (+) a ľavotočivé symbolom (–). Analytická metóda, ktorá sa zameriava na meranie tejto vlastnosti, sa nazýva polarimetria. Optická otáčavosť izolovaných alkaloidov sa merala pomocou polarimetra P3000 v roztokoch pripravených v methanole alebo chloroforme. Špecifická otáčavosť jednotlivých látok bola následne vypočítaná podľa vzorca:

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

- t – teplota pri meraní (°C)
- D – vlnová dĺžka D-línie sodíkového polarizovaného svetla (λ = 589,3 nm)
- α – nameraná optická otáčavosť (°)
- c – koncentrácia látky (g/100 ml)
- l – dĺžka kyvety (dm)

4.6. Testovanie biologickej aktivity

4.6.1. Roztoky činidiel na stanovenie inhibičnej aktivity voči hAChE a hBuChE

Roztok 5 mM DTNB: Tento roztok bol pripravený rozpustením naváženého množstva DTNB v takom objeme 100 mM fosfátového pufra s pH 7,4 tak, aby sa dosiahla konečná koncentrácia 5 mM. Výsledný roztok mal číru až mierne nažltlú farbu. Uchovával sa v chladničke pri 4 °C a jeho použiteľnosť bola maximálne 1 týždeň.

Roztok 10 mM ATChI: Potrebné množstvo ATChI sa rozpustilo v destilovanej vode tak, aby výsledná koncentrácia činidla dosiahla 10 mM. Pripravený roztok bol číry a uskladňoval sa v chladničke pri 4 °C po dobu maximálne 1 týždňa.

Roztok 10 mM BuTChI: Tento roztok sa pripravil rovnakým spôsobom ako ATChI, t. j. rozpustením zodpovedajúceho množstva látky vo vode na konečnú koncentráciu 10 mM. Roztok bol číry a rovnako sa uchovával pri 4 °C v chladničke najviac 1 týždeň.

4.6.2. Príprava fosfátového pufru

Fosfátový pufer s koncentráciou 100 mM a pH 7,4 bol pripravený zmiešaním troch zložiek: 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobný roztok A predstavoval 200 mM roztok dihydrogénfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4), kde 1 liter tohto roztoku obsahoval 24,0 g NaH_2PO_4. Zásobný roztok B bol 200 mM roztok Na_2HPO_4, pričom sa v 1 litri nachádzalo 28,4 g Na_2HPO_4.

4.6.3. Príprava enzýmov

Enzýmy boli získané rekombinantnou technológiou na Katedre chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Hradec Králové. Pracovalo sa s médiom obsahujúcim enzýmy, ktoré sa v čase potreby riedilo 100 mM fosfátovým pufrom s pH 7,4. Riedenie sa uskutočnilo tak, aby konečná hodnota absorbancie zodpovedala rozpätiu 0,08–0,15 pre AChE a 0,15–0,20 pre BuChE. Médium sa následne podľa potreby rozdelilo, zamrazilo a skladovalo pri teplote -22 °C až do jeho ďalšieho použitia.

4.6.4. Stanovenie aktivity enzýmov

Do šiestich jamiek mikrotitračnej dosky sa pipetovalo 8,3 µl fosfátového roztoku rekombinantnej cholínesterázy (hAChE alebo hBuChE). Následne sa pridalo 283 µl roztoku DTNB s koncentráciou 5 mM a 8,3 µl DMSO. Po dôkladnom premiešaní sa zmes inkubovala v inkubačnej komore prístroja pri teplote 37 °C počas 5 minút. Potom sa pridalo 33,3 µl roztoku substrátu (10 mM ATChI alebo BuTChI) a zaznamenala sa absorbancia pri vlnovej dĺžke 412 nm počas jednej minúty. Na základe zaznamenaných hodnôt sa vypočítala aktivita enzýmov a určil sa priemer spolu so smerodajnou odchýlkou.

4.6.5. Stanovenie inhibičnej aktivity voči cholínesterázam

Na meranie inhibičnej aktivity izolovaných alkaloidov voči rekombinantnej hAChE a hBuChE bola použitá Ellmanova spektrofotometrická metóda. Meranie prebiehalo na polystyrénových mikrodoštičkách so 96 jamkami (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reakčné médium pozostávalo z 10 µl roztoku cholínesterázy so stanovenou aktivitou, 20 µl roztoku DTNB (0,01 M) a 40 µl fosfátového pufra (0,1 M). Roztoky skúmaných alkaloidov v objeme 10 µl, pripravené v rôznych koncentráciách potrebných na zostavenie inhibičnej krivky pre výpočet IC_{50}, boli v médiu preinkubované počas 5 minút. Následne sa

pridalo 20 µl substrátu (0,01 M acetylthiolcholínu alebo butyrylthiolcholínu), čím sa iniciovala reakcia. Absorbancia sa merala po dobu jednej minúty pri vlnovej dĺžke 412 nm pomocou prístroja Multimode Microplate Reader Synergy 2 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA). Na výpočet aktivity enzýmu bola použitá príslušná rovnica:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0}\right) . 100$$

- ΔA_i = zmena absorbancie priamo úmerná inhibícii enzýmu
- ΔA_0 = zmena absorbancie slepého vzorku

Inhibičná aktivita skúmaných zlúčenín bola vyjadrená percentom inhibície enzýmov AChE a BuChE pri koncentrácii 100 µM testovanej látky a prípadne hodnotou IC_{50}, ktorá bola následne porovnaná s referenčnými štandardmi známych inhibítorov (galantamín, eserín). Merania prebiehali v jamkách po trojiciach (n = 3) a výsledky sú uvádzané ako priemer ± SD z troch meraní. Na spracovanie údajov a určenie hodnôt IC_{50} bol použitý program GraphPad Prism 6.07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

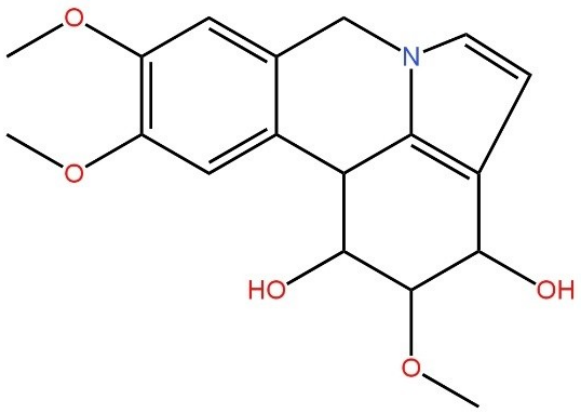
5. Výsledky

5.1. Štruktúrna analýza izolovaných látok

5.1.1. NPR-3-4b-1

Na základe experimentálnych dát sa pri určovaní štruktúry zistilo, že ide o doteraz neopísanú látku (Obr. 34). Pomocou NMR sa podarilo určiť konštitúciu, avšak na stanovenie absolútnej konfigurácie by bolo potrebné vykonať viac experimentov.

Štruktúra:



Obr. 34: Štruktúrny vzorec NPR-3-4b-1.

Molekulárny vzorec:

$C_{18}H_{21}NO_5$

Molekulová hmotnosť:

331,368

GC/MS analýza:

m/z (%) = 89,1 (3,17); 139 (3,58); 140 (4,72); 147,5 (10,6); 165 (4,45); 166 (5,02); 176,9 (3,28); 178 (8,04); 179 (3,35); 190 (3,3); 191 (4,57); 194 (6,71); 207 (11,3); 208 (6,86); 221,1 (6,21); 222 (4,03); 236,1 (3,14); 237 (5,45); 250 (7,88); 251 (3,64); 252 (4,28); 256 (3,61); 264 (3,05); 278,1 (10,43); 279 (6,45); 280,1 (7,93); 281 (4,59); 294,1 (100); 295,1 (87,71); 296,1 (16,24)

HRMS analýza:

teoretická *m/z* $[M+H]^+$ = 332,1493
experimentálna *m/z* $[M+H]^+$ = 332,1481

NMR analýza:

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ:

7.07 (s, 1H, H-1), 6.91 (s, 1H, H-4), 6.78 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-7), 6.21 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-8), 5.08–5.02 (m, 1H, H-5a), 4.98–4.93 (m, 1H, H-5b), 4.98–4.93 (m, 1H, H-12), 4.75–4.73 (m, 1H, H-10), 4.00–3.96 (m, 1H, H-13), 3.91–3.88 (m, 1H, H-11), 3.89 (s, 3H, OCH_3-2, prekryté), 3.85 (s, 3H, OCH_3-3), 3.57 (s, 3H, OCH_3-11)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ:

110.6 (C-1), 149.7 (C-2), 149.0 (C-3), 111.4 (C-4), 127.4 (C-4a), 47.7 (C-5), 126.2 (C-6a), 119.9 (C-7), 108.1 (C-8), 114.7 (C-9), 66.7 (C-10), 84.8 (C-11), 68.2 (C-12), 35.4 (C-13), 126.8 (C-13a), 56.6 (OCH_3-2), 56.6 (OCH_3-3), 58.6 (OCH_3-11)

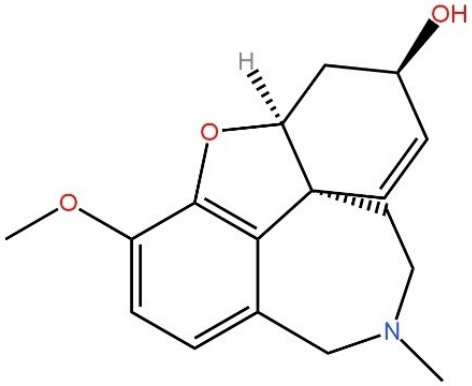
Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20}$= +693,1° (c = 0,05 g/100 ml, $CHCl_3$)

5.1.2. NPR-11-2a-1: Galantamín

Na základe zhody s knižnicou spektier NIST z GC/MS analýzy a porovnaním optickej otáčavosti bola látka identifikovaná ako alkaloid galantamín (Obr. 35).

Štruktúra:



Obr. 35: Štruktúrny vzorec galantamínu.

Molekulárny vzorec:

$C_{17}H_{21}NO_3$

Molekulová hmotnosť:

287,359

GC/MS analýza:

m/z (%) = 55 (5,38); 77,1 (8,79); 91,1 (7,06); 115,1 (16,91); 127,1 (6,29); 128,1 (10,65); 131,1 (5,34); 141,1 (6,75); 150,1 (7,9); 152,1 (6,49); 153,1 (6,18); 159,1 (7,99); 165,1 (10,49); 166,1 (7,22); 169,1 (5,46); 174,1 (31,42); 175,1 (7,4); 185,1 (6,22); 187,1 (6,57); 195,1 (5,51); 201,1 (5,6); 211,1 (7,37); 216,1 (35,25); 226,1 (5,53); 230,1 (12,34); 244,2 (23,01); 270,2 (13,62); 286 ,2 (100); 287,2 (82,99); 288,2 (14,05)

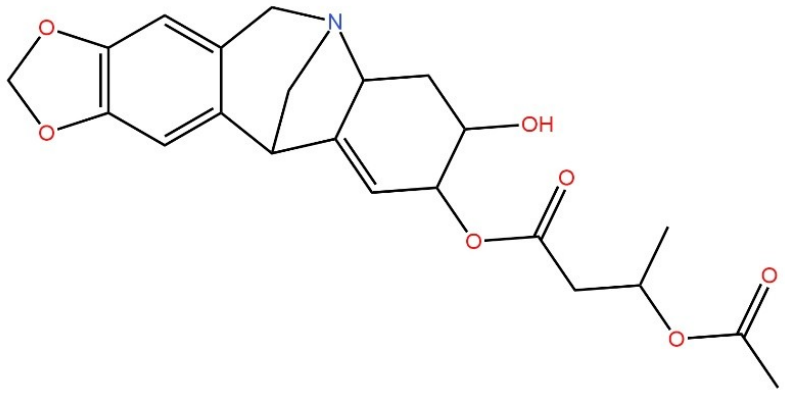
Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20}$= -90,2 ° (c = 0,1 g/100 ml, $CHCl_3$)

5.1.3. NPR-11-4-1

Na základe experimentálnych dát sa pri určovaní štruktúry zistilo, že ide o doteraz neopísanú látku (Obr. 36). Pomocou NMR sa podarilo určiť konštitúciu, avšak na stanovenie absolútnej konfigurácie by bolo potrebné vykonať viac experimentov.

Štruktúra:



Obr. 36: Štruktúrny vzorec NPR-11-4-1.

Molekulárny vzorec:

$C_{22}H_{25}NO_7$

Molekulová hmotnosť:

415,44

GC/MS analýza:

Látka nebola dostatočne prchavá pre GC/MS.

HRMS analýza:

teoretická *m/z* $[M+H]^+$ = 416,1704
experimentálna *m/z* $[M+H]^+$ = 416,1706

NMR analýza:

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ:
6.62 (s, 1H, H-1), 6.57 (s, 1H, H-4), 5.96 (d, J = 9.5 Hz, 2H, –OCH_2O–), 5.60 (s, 1H, H-11), 5.33–5.21 (m, 1H, H-3′), 5.02–4.99 (m, 1H, H-10), 4.69 (d, J = 16.1 Hz, 1H, H-5a), 4.28 (d, J = 16.1 Hz, 1H, H-5b), 4.16–4.08 (m, 1H, H-9), 4.04–3.94 (m, 1H, H-7), 3.70–3.60 (m, 1H, H-13), 3.54–3.45 (m, 1H, H-14a), 3.43–3.36 (m, 1H, H-14b), 2.75–2.66 (m, 1H, H-8a), 2.66–

2.59 (m, 1H, H-2′a), 2.55–2.49 (m, 1H, H-2′b), 2.04 (s, 3H, H-2″), 1.87–1.72 (m, 1H, H-8b), 1.31 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H-4′)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ:

107.6 (C-1), 147.4 (C-2), 147.8 (C-3), 107.1 (C-4), 119.5 (C-4a), 58.4 (C-5), 60.4 (C-7), 29.5 (C-8), 67.7 (C-9), 71.2 (C-10), 114.1 (C-11), 148.4 (C-12), 44.4 (C-13), 128.9 (C-13a), 54.8 (C-14), 101.4 (–OCH_2O–), 169.7 (C-1′), 40.9 (C-2′), 67.2 (C-3′), 20.1 (C-4′), 170.3 (C-1″), 21.2 (C-2″)

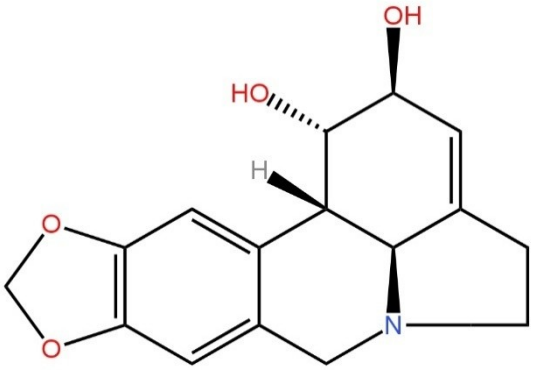
Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20}$= -10,9° (c = 0,1 g/100 ml, $CHCl_3$)

5.1.4. NPR-11-5a: Lykorín

Na základe presnej zhody s knižnicou spektier NIST z GC/MS analýzy a porovnaním optickej otáčavosti bola látka identifikovaná ako alkaloid lykorín (Obr. 37).

Štruktúra:



Obr. 37: Štruktúrny vzorec lykorínu

Molekulárny vzorec:

$C_{16}H_{17}NO_4$

Molekulová hmotnosť:

287,32

GC/MS analýza:

m/z (%) = 63,1 (3,14); 65,1 (4,72); 77,1 (5,71); 82,1 (3,78); 89,1 (4,97); 91,1 (6,08); 96,5 (3,18); 111,1 (5,12); 119,1 (6,73); 135 (4,12); 147,1 (9,97); 154,1 (3,14); 211,1 (4,37); 212,1 (4,09); 2 26,1 (100); 227,1 (59,46); 228,1 (9,17); 238,1 (3,61); 240,1 (4,47); 250,1 (17,01); 251,1 (5,81); 252,1 (5,93); 256,2 (4,44); 266,1 (3,94); 268,1 (20,12); 269,2 (4,76); 270,2 (5,51); 286,1 (14,95); 287,2 (23); 288,1 (3,67)

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20}$= -77,6 ° (c = 0,1 g/100 ml, MeOH)

5.2. Biologická aktivita izolovaných alkaloidov

Izolované alkaloidy boli testované na inhibičnú aktivitu voči hAChE a hBuChE pomocou upravenej metódy podľa Ellmana (Tab. 2). Inhibičná aktivita galantamínu a lykorínu nebola meraná, pretože k týmto dvom látkam je dostupné množstvo štúdií. Pre úplnosť sú ich hodnoty uvedené v tabuľke na základe dostupných referencií. Ako štandard bol použitý eserín. Vzorky boli testované pri koncentrácii 100 μM. Ak inhibičná aktivita nedosiahla aspoň 50 %, látka bola považovaná za neaktívnu s IC_{50} > 100 μM. Merania prebiehali v triplikáte a výsledky sú uvádzané ako priemer ± SD z troch stanovení.

Tab. 2: Výsledky inhibičnej aktivity získaných alkaloidov voči ľudským cholínesterázam.

	% inhibícia AChE (100 μM)	IC_{50} AChE (μM)	% inhibícia BuChE (100 μM)	IC_{50} BuChE (μM)
NPR-3-4b-1	0	> 100	10,39 ± 1,81	> 100
NPR-11-4-1	0	> 100	0	> 100
NPR-11-5a (Lykorín)	-	> 100[a]	-	> 100[a]
NPR-11-2a-1 (Galantamín)	-	1,72 ± 0,12[b]	-	42,3 ± 1,3[b]
Eserín	-	0,063 ± 0,005[b]	-	0,13 ± 0,01[b]

[a]údaj prevzatý z inej publikácie (7), [b]údaj prevzatý z inej publikácie (57)

6. Diskusia a záver

Rastliny čeľade Amaryllidaceae sú bohatým zdrojom biologicky aktívnych alkaloidov, ktoré sa skúmajú pre svoje rozmanité farmakologické účinky. Medzi tieto účinky patrí napríklad inhibícia cholinesteráz, antivírusová, protizápalová, protinádorová a neuroprotektívna aktivita. Schopnosť niektorých alkaloidov inhibovať aktivitu AChE a BuChE prispieva k zlepšeniu kognitívnych funkcií u ľudí s AD. AD postihuje milióny ľudí vo svete a jej výskyt stále rastie s narastajúcim vekom populácie, preto je dôležité hľadať nové účinné spôsoby liečby (7). Výskum alkaloidov je preto dôležitý a môže priniesť cenné informácie pre objavovanie nových možností liečby AD.

Predmetom tejto diplomovej práce bola izolácia čistých alkaloidov z alkaloidného extraktu cibúľ *Narcissus poeticus* var. *recurvus* a následné vyhodnotenie ich inhibičnej aktivity voči ľudským cholínesterázam. Alkaloidný extrakt bol pripravený a frakcionovaný pomocou flash chromatografie v rámci inej diplomovej práce, pri ktorej bolo získaných 168 frakcií, ktoré sa následne zlúčili do 19 hlavných frakcií (56). Pre účely tejto práce boli vybrané frakcie označené ako NPR-3, NPR-4 a NPR-11, z ktorých sa pomocou preparatívnej TLC podarilo izolovať štyri alkaloidy. Pomocou analytických metód boli tieto látky identifikované ako galantamín (NPR-11-2a-1), lykorín (NPR-11-5a) a dve doteraz neopísané zlúčeniny (NPR-3-4b-1 a NPR-11-4-1).

Izolované látky galantamín (91,83 mg) a lykorín (7,34 mg) boli identifikované, avšak ich inhibičná aktivita voči cholínesterázam nebola experimentálne testovaná, keďže tieto údaje sú už dostatočne zdokumentované v literatúre. Galantamín je klinicky schválený inhibítor AChE, pričom literárne zdroje uvádzajú hodnoty IC_{50} pre AChE 1,72 ± 0,12 µM a pre BuChE 42,3 ± 1,3 µM (57). Tieto výsledky potvrdzujú jeho účinnosť voči AChE, čo zodpovedá jeho terapeutickému využitiu pri liečbe Alzheimerovej choroby. Naopak, lykorín nevykazuje inhibičnú aktivitu voči AChE (7). Zistená prítomnosť galantamínu a lykorínu potvrdzuje výskyt týchto alkaloidov v rode *Narcissus*, čo je v súlade s literárnymi údajmi (8).

Izolovaná látka označená ako NPR-3-4b-1 (21,8 mg) predstavuje doteraz neopísanú zlúčeninu lykorínového typu alkaloidov. Bola určená konštitúcia tohto alkaloidu, avšak absolútna konfigurácia zatiaľ nebola pre časové obmedzenia ďalej stanovená a môže byť predmetom budúceho výskumu, napr. pomocou röntgenovej kryštalografie (X-ray) alebo cirkulárneho dichroizmu. Limitujúcim faktorom pre jej budúce skúmanie môže byť potenciálna nestabilita, pretože počas izolácie a niekoľkonásobnému prečisťovaniu bolo náročné získať čistú látku, ktorá by bola merateľná NMR; vzorka bola preto následne uchovávaná v mrazničke

pod inertným plynom. Napriek možnej nestabilite bola inhibičná aktivita tejto látky voči cholínesterázam vyhodnotená pomocou Ellmanovej metódy. Získané výsledky ukázali, že NPR-3-4b-1 nevykazuje inhibičný účinok na AChE, zatiaľ čo pri BuChE dosiahla inhibíciu približne 10 % pri koncentrácii 100 µM, pričom hodnota IC_{50} bola vyššia než 100 µM (Tab. 2). Tieto údaje naznačujú, že alkaloid NPR-3-4b-1 sa nejaví ako vhodný inhibítor týchto enzýmov. Napriek tomu jej identifikácia ako novej zlúčeniny môže slúžiť ako základ pre ďalšie chemické a biologické štúdie, ktoré však môžu byť vzhľadom na možnú nestabilitu zlúčeniny komplikované.

Alkaloid označený ako NPR-11-4-1 (57,68 mg) predstavuje prírodnú zlúčeninu montanínového typu amarylkovitých alkaloidov, ktorá doteraz nebola popísaná. Jej konštitúcia bola určená pomocou NMR spektroskopie, zatiaľ čo absolútna konfigurácia nebola stanovená. Na jej stanovenie by bolo potrebné použiť napr. jednokryštálovú röntgenovú difrakciu (X-ray) a prípadne cirkulárny dichroizmus; ich využitie však už presahovalo časové možnosti tejto diplomovej práce. Skúmanie inhibičného účinku na cholínesterázy ukázalo, že NPR-11-4-1 nevykazuje inhibíciu ani na AChE, ani na BuChE (Tab. 2). Napriek absencii inhibičného účinku predstavuje táto zlúčenina krok v objave nových alkaloidov a poskytuje možnosť pre ďalšie štúdie, najmä z hľadiska stanovenia stereochémie a skúmanie jej ďalších biologických vlastností.

Z hľadiska štruktúra-aktivita vzťahov možno nízku aktivitu nových zlúčenín voči AChE/BuChE pripísať absencii kľúčových substituentov (napr. v polohách C-1/C-2 pri lykorínovom type) a odlišnej topológii väzbových interakcií v aktívnych miestach enzýmov. To je v súlade s literatúrou, kde sa aktivita často výrazne mení aj pri drobných modifikáciách skeletu. Negatívny výsledok tak usmerňuje ďalšie smerovanie testov k alternatívnym cieľom.

Z vyššie uvedeného vyplýva, že hoci novo izolované zlúčeniny NPR-3-4b-1 a NPR-11-4-1 nevykázali významnú inhibíciu cholínesteráz, ich identifikácia rozširuje poznatky o chemickej diverzite rodu *Narcissus* a vytvára východisko pre ďalší výskum. Do budúcna je možné vykonať stanovenie absolútnej konfigurácie (napr. jednokryštálová X-ray difrakcia a cirkulárny dichroismus) a rozšírené biologické profilovanie mimo AChE/BuChE (napr. MAO, BACE1, modulácia Aβ agregácie, anti-inflamačné, antivírusové či cytotoxické účinky). Negatívny výsledok v jednej farmakologickej triede tak má hodnotu: usmerňuje smerovanie ďalších testov a podopiera chemotaxonomickú anotáciu druhu *N. poeticus* var. *recurvus*.

7. Abstrakt

Spracovateľ: Erika Šrámková

Názov diplomovej práce: Izolácia alkaloidov z *Narcissus poeticus recurvus* a ich biologická aktivita II

Univerzita: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognózie a farmaceutickej botaniky

Školiteľ: PharmDr. Rudolf Vrabec, Ph.D.

V tejto práci boli spracované tri predom pripravené frakcie alkaloidného extraktu z cibúľ rastliny *Narcissus poeticus* var. *recurvus*. Pomocou preparatívnej TLC chromatografie sa podarilo izolovať štyri alkaloidné zlúčeniny, medzi ktoré patrili známe zlúčeniny galantamín a lykorín a dve doteraz nepopísané alkaloidy lykorínového a montanínového typu. Ich štruktúra bola overená analytickými metódami, ako sú NMR, GC-MS, HRMS a stanovenie optickej otáčavosti. Testovanie inhibičnej aktivity nových alkaloidov voči ľudskej AChE a BuChE bolo vykonané pomocou Ellmanovej metódy, pričom žiadna z látok nevykázala významný inhibičný účinok (IC_{50} > 100 μM). Obe nové zlúčeniny boli charakterizované na úrovni konštitúcie; absolútna konfigurácia nebola stanovená. Napriek absencii inhibície voči cholínesterázam ich identifikácia rozširuje diverzitu amarylkovitých alkaloidov a poskytuje východisko pre následné štúdie stereochémie a ďalších biologických aktivít mimo AChE/BuChE.

8. Abstract

Author: Erika Šrámková

Title of the Thesis: Isolation of alkaloids from *Narcissus poeticus recurvus* and their biological activity II

University: Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Supervisor: PharmDr. Rudolf Vrabec, Ph.D.

In this study, three pre-prepared fractions of the alkaloid extract from the bulbs of *Narcissus poeticus* var. *recurvus* were processed. Using preparative TLC chromatography, four alkaloid compounds were successfully isolated, including the known alkaloids galantamine and lycorine, as well as two previously undescribed alkaloids of the lycorine and montanine type. Their structures were confirmed by analytical methods such as NMR, GC-MS, HRMS, and optical rotation determination. The inhibitory activity of the new alkaloids against human AChE and BuChE was evaluated using Ellman's method, and none of the compounds exhibited significant inhibitory effects (IC_{50} > 100 μM). Both new compounds were characterized at the level of constitution; their absolute configurations were not determined. Despite the absence of cholinesterase inhibition, their identification broadens the diversity of Amaryllidaceae alkaloids and provides a basis for subsequent studies of stereochemistry and other biological activities beyond AChE/BuChE.

9. Zoznam použitej literatúry

1. **Petrovska B. B.** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews.* 2012, Zv. 6, 11, s. 1–5. doi: 10.4103/0973-7847.95849

2. **Moreno R., Tallini L. R., Salazar C., Osorio E. H., Montero E., Bastida J., Oleas N. H., Acosta León K.** Chemical Profiling and Cholinesterase Inhibitory Activity of Five Phaedranassa Herb. (Amaryllidaceae) Species from Ecuador. *Molecules.* 2020, Zv. 25, 9, s. 2092. doi: 10.3390/molecules25092092

3. **Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.** *Farmakognozie.* Praha: Nakladatelství Karolinum, 2016.

4. **Ka S., Koirala M., Mérindol N., Desgagné-Penix I.** Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules.* 2020, Zv. 25, 21, s. 4901. doi: 10.3390/molecules25214901

5. **Paiva M. J. M., Nascimento G. N. L., Damasceno I. A. M., Santos T. T., Silveira D.** Pharmacological and toxicological effects of Amaryllidaceae. *Brazilian Journal of Biology.* 2023, Zv. 83, s. e277092. doi: 10.1590/1519-6984.277092

6. **Jahodář L.** Farmakobotanika: semenné rostliny. Praha: Karolinum, 2009.

7. **Kohelová E., Maříková J., Korábečný J., Hulcová D., Kučera T., Jun D., Chlebek J., Jenčo J., Šafratová M., Hrabinová M., Ritomská A., Malaník M., Peřinová R., Breiterová K., Kuneš J., Nováková L., Opletal L., Cahlíková L.** Alkaloids of Zephyranthes citrina (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry.* 2021, Zv. 107, s. 104567. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104567

8. **Bastida J., Lavilla R., Viladomat F.** Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Biology.* 2006, Zv. 63, s. 87–179. doi: 10.1016/s1099-4831(06)63003-4

9. **Al Mamun A., Maříková J., Hulcová D., Janoušek J., Šafratová M., Nováková L., Kučera T., Hrabinová M., Kuneš J., Korábečný J., Cahlíková L.** Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules.* 2020, Zv. 10, 5, s. 800. doi: 10.3390/biom10050800

10. **Hulcová D.** Biologická aktivita alkaloidů *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae). Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018. Doktorská disertační práce.

11. **Graham S. W., Barrett S. C. H.** Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in Narcissus (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany.* 2004, Zv. 91, 7, s. 1007–1021. doi: 10.3732/ajb.91.7.1007

12. **BioLib.cz.** *Narcissus* L. [online] [Cit.: 5. 3. 2025.] https://www.biolib.cz/cz/taxon/id42016/.

13. **Compton J.** *Narcissus recurvus* Haw. A crisis of identity. *Curtis's Botanical Magazine.* 2023, Zv. 40, 2, s. 249–261. doi: 10.1111/curt.12511

14. **GARDENIA.NET.** *Narcissus poeticus* var. *recurvus* (Poeticus Daffodil). [online] [Cit.: 5. 3. 2025.] https://www.gardenia.net/plant/narcissus-poeticus-var-recurvus-poeticus-daffodil.

15. **The Royal Horticultural Society.** *Narcissus poeticus* var. *recurvus* Haw. (13). [online] [Cit.: 5. 3. 2025.] https://www.rhs.org.uk/plants/529914/narcissus-poeticus-var-recurvus-haw-(13)/details.

16. **Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.** Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy.* 2013, Zv. 107, s. 701–708.

17. **Jayawardena T. U., Merindol N., Liyanage N.S., Desgagné-Penix I.** Unveiling Amaryllidaceae alkaloids: from biosynthesis to antiviral potential – a review. *Natural Product Reports.* 2024, Zv. 41, 5, s. 721–747. doi: 10.1039/d3np00044c

18. **Breiterová K.** Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.

19. **Aleya F., Xianmin C., Anthony H., Meriel J.** Relative expression of putative genes involved in galanthamine and other Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis in Narcissus field and in vitro tissues. *Gene.* 2021, Zv. 774., s. 145424. doi: 10.1016/j.gene.2021.145424

20. **Cahlíková L., Vaněčková N., Šafratová M., Breiterová K., Blunden G., Hulcová D., Opletal L.** The Genus Nerine Herb. (Amaryllidaceae): Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activity. *Molecules.* 2019, Zv. 24, 23, s. 4238. doi: 10.3390/molecules24234238

21. **Takos A. M., Rook F.** Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013, Zv. 14, 6, s. 11713–11741. doi: 10.3390/ijms140611713

22. **Boshra Y. R., Fahim J. R., Hamed A. N. E., Desoukey S. Y.** Phytochemical and biological attributes of *Narcissus pseudonarcissus* L. (Amaryllidaceae): A review. *South African Journal of Botany.* 2022, Zv. 146, s. 437–458. doi: 10.1016/j.sajb.2021.11.028

23. **Evidente A., Kireev A. S., Jenkins A. R., Romero A. E., Steelant W. F., Van Slambrouck S., Kornienko A.** Biological evaluation of structurally diverse amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica.* 2009, Zv. 75, 5, s. 501–507. doi: 10.1055/s-0029-1185340

24. **He M., Qu Ch., Gao O., Hu X., Hong X.** Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances.* 2015, Zv. 5, s. 16562–16574. doi: 10.1039/C4RA14666B

25. **De Andrade J. P., Pigni N. B., Torras-Claveria L., Guo Y., Berkov S., Reyes-Chilpa R., El Amrani A., Zuanazzi J. A. S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.** Alkaloids from the Hippeastrum genus: Chemistry and biological activity. *Revista Latinoamericana de Química.* 2012, Zv. 40, 2, s. 85–98.

26. **Hu N., White L. V., Lan P., Banwell M. G.** The Chemical Synthesis of the Crinine and Haemanthamine Alkaloids: Biologically Active and Enantiomerically-Related Systems that Serve as Vehicles for Showcasing New Methodologies for Molecular Assembly. *Molecules.* 2021, Zv. 26, 3, s. 765. doi: 10.3390/molecules26030765

27. **Tallini L. R., Giordani R. B., de Andrade J. P., Bastida J., Zuanazzi J. A. S.** Structural Diversity and Biological Potential of Alkaloids from the Genus Hippeastrum, Amaryllidaceae: an Update. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2021, Zv. 31, 5, s. 648–657. doi: 10.1007/s43450-021-00211-z

28. **Cheng B., Wang Q., An Y., Chen F.** Recent advances in the total synthesis of galantamine, a natural medicine for Alzheimer's disease. *Natural Product Reports.* 2024, Zv. 41, 7, s. 1060–1090. doi: 10.1039/d4np00001c

29. **Koutová D., Havelek R., Peterová E., Muthná D., Královec K., Breiterová K., Cahlíková L., Řezáčová M.** Pancracine, a Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloid, Inhibits Proliferation of A549 Lung Adenocarcinoma Cells and Induces Apoptotic Cell Death in MOLT-4 Leukemic Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021, Zv. 22, 13, s. 7014. doi: 10.3390/ijms22137014

30. **Fürst R.** Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica.* 2016, Zv. 82, 16, s. 1389–1394. doi: 10.1055/s-0042-115034

31. **Griffin C., Sharda N., Sood D., Nair J., McNulty J., Pandey S.** Selective cytotoxicity of pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International.* 2007, Zv. 7, s. 10. doi: 10.1186/1475-2867-7-10

32. **Makolo F., Viljoen A., Veale C. G. L.** Mesembrine: The archetypal psycho-active Sceletium alkaloid. *Phytochemistry.* 2019, Zv. 166, s. 112061. doi: 10.1016/j.phytochem.2019.112061

33. **Krstenansky J. L.** Mesembrine alkaloids: Review of their occurrence, chemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology.* 2017, Zv. 195, s. 10–19. doi: 10.1016/j.jep.2016.12.004

34. **Oleksak P., Novotny M., Patocka J., Nepovimova E., Hort J., Pavlik J., Klimova B., Valis M., Kuca K.** Neuropharmacology of Cevimeline and Muscarinic Drugs – Focus on Cognition and Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021, Zv. 22, 16, s. 8908. doi: 10.3390/ijms22168908

35. **Jirák R.** Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi.* 2008, Zv. 9, 4, s. 240–244.

36. **Bartko D., Čombor I., Madarász Š., Luliak M.** Demencia Alzheimerovho typu. *Via practica.* 2008, Zv. 5, 10, s. 398–402.

37. **Breijyeh Z., Karaman R.** Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020, Zv. 25, 24, s. 5789. doi: 10.3390/molecules25245789

38. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2023, Zv. 19, 4, s. 1598–1695. doi: 10.1002/alz.13016

39. **Zheng Q., Wang X.** Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy. *Protein Cell.* 2025, Zv. 16, 2, s. 83–120. doi: 10.1093/procel/pwae026

40. **Wong K. H., Riaz M. K., Xie Y., Zhang X., Liu Q., Chen H., Bian Z., Chen X., Lu A., Yang Z.** Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019, Zv. 20, 2, s. 381. doi: 10.3390/ijms20020381

41. **Khan S., Barve K. H., Kumar M. S.** Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology.* 2020, Zv. 18, 11, s. 1106–1125. doi: 10.2174/1570159X18666200528142429

42. **Ashrafian H., Zadeh E. H., Khan R. H.** Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2021, Zv. 167, s. 382–394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.192

43. **Cahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.** Chapter 6. Natural Compounds (Small Molecules) as Potential and Real Drugs of Alzheimer's Disease. [ed.] Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier, 2014, Zv. 42, s. 153–194. doi: 10.1016/B978-0-444-63281-4.00006-9

44. **Briggs R., Kennelly S. P., O'Neill D.** Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine (London).* 2016, Zv. 16, 3, s. 247–253. doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247

45. **Ferreira-Vieira T. H., Guimaraes I. M., Silva F. R., Ribeiro F. M.** Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology.* 2016, Zv. 14, 1, s. 101–115. doi: 10.2174/1570159x13666150716165726

46. **Hynd M. R., Scott H. L., Dodd P. R.** Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International.* 2004, Zv. 45, 5, s. 583–595. doi: 10.1016/j.neuint.2004.03.007

47. **Zott B., Konnerth A.** Impairments of glutamatergic synaptic transmission in Alzheimer's disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2023, Zv. 139, s. 24–34. doi: 10.1016/j.semcdb.2022.03.013

48. **Dong X. X., Wang Y., Qin Z. H.** Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2009, Zv. 30, 4, s. 379–387. doi: 10.1038/aps.2009.24

49. **Bocwińska-Kiluk B., Jelski W., Kornhuber J., Lewczuk P., Mroczko B.** Alzheimer's Disease-Biochemical and Psychological Background for Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023, Zv. 24, 2, s. 1059. doi: 10.3390/ijms24021059

50. **Kueper J. K., Speechley M., Montero-Odasso M.** The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2018, Zv. 63, 2, s. 423–444. doi: 10.3233/JAD-170991

51. **Passeri E., Elkhoury K., Morsink M., Broersen K., Linder M., Tamayol A., Malaplate C., Yen F. T., Arab-Tehrany E.** Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022, Zv. 23, 22, s. 13954. doi: 10.3390/ijms232213954

52. **SÚKL.** Přehled léčiv. [online] [Cit.: 17. 7 2025.] https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html.

53. **Stoiljkovic M., Horvath T. L., Hajós M.** Therapy for Alzheimer's disease: Missing targets and functional markers? *Ageing Research Reviews.* 2021, Zv. 68, s. 101318. doi: 10.1016/j.arr.2021.101318

54. **Arroyo-Pacheco N., Sarmiento-Blanco S., Vergara-Cadavid G., Castro-Leones M., Contreras-Puentes N.** Monoclonal therapy with lecanemab in the treatment of mild Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews.* 2025, Zv. 104, s. 102620. doi: 10.1016/j.arr.2024.102620

55. **Yu T. W., Lane H. Y., Lin C. H.** Novel Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease: An Updated Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021, Zv. 22, 15, s. 8208. doi: 10.3390/ijms22158208

56. **Hašanová S.** Amaryllidaceae alkaloids of Narcissus poeticus var. recurvus and their implication to Alzheimer's disease and anticancer activity. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2024.

57. **Vrabec R., Maříková J., Ločárek M., Korábečný J., Hulcová D., Hošťálková A., Kuneš J., Chlebek J., Kučera T., Hrabinová M., Jun D., Soukup O., Andrisano V., Jenčo J., Šafratová M., Nováková L., Opletal L., Cahlíková L.** Monoterpene indole alkaloids from Vinca minor L. (Apocynaceae): Identification of new structural scaffold for treatment of

Alzheimer's disease. *Phytochemistry.* 2022, Zv. 194, s. 113017. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.113017