

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin III.
Alkaloidy *Narcissus tazetta* L.**

**Biological activity of secondary plants metabolites III.
Alkaloids of *Narcissus tazetta* L.**

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

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Ločárek

Hradec Králové, 2015

Markéta Panchartková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2015

.....

podpis

Chtěla bych poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Miroslavovi Ločárkovi za pomoc, rady a poskytnuté materiály k vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za změření biologických aktivit alkaloidních extraktů. Děkuji také všem ostatním členům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za rady a pomoc v průběhu mé práce.

Obsah

1	ÚVOD.....	5
2	Cíl práce.....	7
	Cíle diplomové práce.....	8
3	Teoretická část	9
3.1	Alzheimerova choroba	10
3.1.1	Klinický obraz	10
3.1.2	Příčina nemoci.....	10
3.1.3	Léčba AD.....	14
3.2	Čeleď Amaryllidaceae.....	21
3.2.1	Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů	21
3.2.2	Typy amarylkovitých alkaloidů	24
3.2.3	Rod <i>Narcissus</i>	29
4	Experimentální část.....	34
4.1	Všeobecné postupy.....	35
4.1.1	Destilace a odpařování.....	35
4.2	Materiál a vybavení.....	35
4.2.1	Rozpouštědla.....	35
4.2.2	Chemikálie.....	35
4.3	Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza.....	36
4.3.1	GC/MS analýza a identifikace alkaloidů	36
4.3.2	Příprava ethanolických a alkaloidních extraktů	36
4.4	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE 37	
4.4.1	Chemikálie, pufrý a materiál pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity37	
4.4.2	Podmínky měření	38
4.4.3	Přístroj pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	38
4.4.4	Příprava materiálu.....	38
4.4.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC ₅₀).....	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
5.1	GC/MS analýza <i>Narcissus tazetta</i> cv. Abba.....	41
5.2	GC/MS analýza <i>Narcissus tazetta</i> cv. Bridal crown.....	42

5.3	GC/MS analýza <i>Narcissus tazetta</i> cv. Cragford	43
5.4	GC/MS analýza <i>Narcissus tazetta</i> cv. Falkonet	44
5.5	GC/MS analýza <i>Narcissus tazetta</i> cv. Golden down	45
5.6	GC/MS analýza <i>Narcissus tazetta</i> cv. Hoopol	46
5.7	GC/MS analýza <i>Narcissus jonquilla</i> cv. New baby.....	47
5.8	Biologická aktivita alkaloidních extraktů <i>Narcissus tazetta</i> a <i>Narcissus jonquilla</i>	52
6	Závěr.....	54
7	Literatura.....	56
8	Seznam zkratek	64
	Abstrakt	

1 ÚVOD

Již od nepaměti je mnoho rostlin užíváno v terapii různých onemocnění. Mezi rostliny s léčivými účinky patří i čeleď *Amaryllidaceae*. Kromě okrasného využití jsou rostliny této čeledi pěstovány po celém světě pro vysoký obsah alkaloidů. V čeledi *Amaryllidaceae* bylo těchto strukturně různorodých sloučenin izolováno přes 500¹.

Alkaloidy jsou skupinou látek s velkým rozšířením v přírodě. Vyznačují se tím, že obsahují atom dusíku v heterocyklickém kruhu, který je odvozen od aminokyselin L-tyrosinu, L-ornitinu, L-lysinu, L-tryptofanu, L-histidinu a L-fenylalaninu. Jsou to velice reaktivní substance s biologickou aktivitou i ve velice nízkých koncentracích. Všechny alkaloidy mají hořkou chuť a jsou to tuhé, krystalické a bezbarvé látky. Výjimkou je nikotin, který je tekutý a má hnědou barvu. Jejich charakter je bazický a proto tvoří soli s kyselinami².

Galantamin je v dnešní době zatím jediný alkaloid čeledi *Amaryllidaceae*, který je registrovaný jako léčivo. Tento inhibitor acetylcholinesterázy je součástí léčby Alzheimerovy nemoci, při níž zpomaluje proces neurologické degenerace. Přestože galantamin může být produkován synteticky, rostliny stále zůstávají hlavním zdrojem pro farmaceutický průmysl³. Byly izolovány i další alkaloidy této čeledi, u kterých byly zjištěny účinky antibakteriální, antivirotické, antifungální, analgetické, protizánětlivé a cytotoxické. Pro své účinky si proto zaslouží, aby byly dále zkoumány a byla jim věnována hlubší pozornost⁴.

2 Cíl práce

Cíle diplomové práce

- 1) Příprava alkaloidních extraktů *Narcissus tazetta* (L.)
- 2) GS/MS analýza alkaloidních extraktů
- 3) Příprava vzorků na biologické testování
- 4) Stanovení inhibiční aktivity alkaloidního extraktu vůči lidské acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze

3 Teoretická část

3.1 Alzheimerova choroba

Poprvé byla Alzheimerova nemoc (AD) popsána profesorem Aloisem Alzheimerem, který v roce 1906 představil případ pacientky s příznaky této nemoci⁵.

Na AD připadají přibližně 2/3 všech případů demencí. Je tedy nejčastější příčinou demence a její výskyt roste s věkem. V 62,5 letech postihuje přibližně 1,5 % populace, zatímco v 85. roce je postižen již každý 3. člověk⁶. Doba trvání nemoci se liší. V průměru je to však 9 let⁵. Jelikož dochází ke stárnutí populace po celém světě, začíná být AD, která zatím není bohužel vyléčitelná, značným problémem⁷.

3.1.1 Klinický obraz

AD ovlivňuje lidi různě. Jedním z prvních příznaků jsou jen malé změny v chování, osobnosti a návycích člověka. Pro pomalý a nenápadný nástup se často stává, že nemoc není odhalena včas⁵. Nejběžnějším symptomem je postupně se zhoršující schopnost zapamatování nových informací. Narušen je každodenní život. Pacient není schopen plánování, řešení a dokončení známých úkolů, ať už doma nebo v práci. Nově se začínají objevovat problémy s mluvením a psaním. Následkem toho nemocný často přichází o práci a není schopen vést společenský život. V pokročilé fázi nemoci pacient potřebuje pomoc i se základními činnostmi každodenního života, jako je koupání, stravování, oblékání. Pacient je zmatený, dezorientovaný a nedokáže rozpoznat ani milovat své blízké. AD je v konečné fázi fatální⁸.

3.1.2 Příčina nemoci

Přesná příčina AD je neznámá. Existuje ale několik teorií, které se snaží popsat vznik a příčinu této nemoci.

3.1.2.1 Cholinergní hypotéza

V roce 1970 bylo zjištěno, že mozek pacientů s AD trpí nedostatkem acetylcholinu (ACh). Ten je jedním z hlavních neurotransmiterů v centrálním nervovém systému. ACh zvyšuje pozornost a usnadňuje proces učení. Tento objev vedl k cholinergní hypotéze. Ta tvrdí, že kognitivní, funkční a behaviorální dysfunkce spojená s AD může být způsobena neschopností přenosu neurologických impulzů přes cholinergní synapse. Studie ukazují, že pacienti mají sníženou aktivitu cholin acetyltransferázy (ChAT), enzymu syntetizujícího ACh z cholinu a acetyl koenzymu A (acetylCoA)⁹. Hladina ACh je regulována cholinesterázami, které se v lidském těle vyskytují ve 2 formách - jako acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE). Obě formy se liší geneticky, strukturálně a také kineticky.

BuChE, také nazývána jako nescifická cholinesteráza, sérová cholinesteráza či pseudocholinesteráza, není fyziologickým substrátem v mozku savců. BuChE se nachází převážně v gliových buňkách nebo je součástí neuritických plaků či tangles u pacientů s AD²⁴. AChE je převážně exprimována v tkáních jako je mozek, svaly a v erythrocytech, zatímco BuChE je přednostně přítomna v plazmě, protože je syntetizována v játrech a sekretována do cirkulace²⁵.

Role BuChE není zatím plně objasněna. Je známo, že se podílí na metabolizaci některých sloučenin jako je kokain, heroin nebo svalového myorelaxansu suxamethonia. Oba enzymy patří do rodiny serinových hydroxyláz²⁶. Přestože jsou produktem dvou různých genů (gen pro AChE je uložen na 7. chromozomu, pro BuChE na 3. chromozomu), sdílí 65 % aminokyselinové sekvenční homologie²⁷.

AChE i BuChE existují v různých molekulárních formách, jako globulární monomery G1, dimery G2 a tetramery G4. Stejně jako asymetrické molekuly s jedním (A1), dvěma (A2) nebo třemi (A3) tetramery. Fyziologická funkce je zprostředkována pravděpodobně G4 formou.

U AD je hladina AChE snížena až o 90 % (ve srovnání s fyziologickým stavem), zatímco hladina BuChE se zvyšuje¹⁰. Existuje několik faktorů, které podporují fakt, že BuChE je lepším potenciálním cílem v léčbě AD. BuChE je totiž také méně účinně hydrolyzována než AChE. Tudíž je AChE inhibována ACh, zatímco BuChE zůstává nedotčena. To znamená že látky, které inhibují jak AChE, tak BuChE, mohou mít

výhody oproti těm, které inhibují pouze AChE. Nicméně nebylo prokázáno, že by byly inhibitory BuChE účinnější než inhibitory AChE ve snížení AD příznaků²⁸.

Na cholinergní hypotéze je založena většina v současné době dostupných léčiv – inhibitorů cholinesteráz¹¹. Ideální kombinací by bylo vyvinout léky, které inhibují cholinesterázy a zároveň působí na β -amyloid¹⁰.

3.1.2.2 Amyloidová hypotéza

Další hypotéza navrhuje, že neurodegenerace u AD mohou způsobovat depozita β -amyloid peptidu, která tvoří plaky v mozkové tkáni. Akumulace tohoto peptidu má pak primární vliv na vznik AD¹².

β -amyloid je peptid skládající se z 36-43 aminokyselin¹³. Vzniká z amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Neurony ho přirozeně obsahují a je důležitý pro jejich fungování. Při AD dochází k jeho zvýšenému štěpení nebo je štěpení pozměněno. Následkem této nerovnováhy dochází ke koagulaci a tvorbě shluků β -amyloidu. Tyto nepravidelné okrouhlé útvary se nazývají neuritické plaky a způsobují destrukci nervové tkáně¹⁴.

Zajímavostí je, že β -amyloid byl izolován také u pacientů s Downovým syndromem. Analýza sekvence aminokyselin ukázala, že se jedná o stejný β protein jako u AD¹⁵. Bylo zjištěno, že vysoký výskyt AD u těchto pacientů je dán geneticky. Gen kódující APP se totiž nachází na 21. chromozomu, jehož trizomie vede k Downovu syndromu, a tudíž i k abnormálně velké produkci β -amyloidu¹⁶.

3.1.2.3 Tau hypotéza

Tau hypotéza je založena na názoru, že tau protein spouští kaskádu onemocnění¹⁷, při níž dochází k nadměrné nebo abnormální fosforylaci tau proteinu do tzv. PHF (spárovaných helikálních vláken)¹⁸.

Hlavní biologickou funkcí tau proteinu je shromažďovat mikrotubuly a stabilizovat jejich strukturu. Tato biologická aktivita tau proteinu je regulována jeho stupněm fosforylace. Hyperfosforylace pak snižuje jeho schopnost shromažďovat mikrotubuly¹⁹.

Tau protein se u lidí nachází v neuronech. V lidském mozku existuje 6 izoform¹³ s rozmezím od 352 do 441 aminokyselin. Všech 6 izoform je fosforylováno¹⁸.

Podle této teorie se tedy jeví tau patologie (a z toho plynoucí neurofibrilární degenerace) jako centrální mechanismus vedoucí k demenci u AD¹⁹. Objevením mutace tau genu, který způsobuje fronto-temporální demenci a parkinsonismus se ukazuje, že dysfunkce v nepřítomnosti amyloid patologie byla dostatečná ke ztrátě neuronů a klinické demenci.

Tato hypotéza položila základ k hledání inhibitorů kinázy jako potenciálních léčiv. Navzdory toxicitě kináz a jejich specifík bylo vyvinuto několik kinázových inhibitorů a některé z nich budou testovány v klinickém hodnocení²⁰.

3.1.2.4 Vaskulární hypotéza

Mnoho důkazů naznačuje, že AD je hlavně cévní onemocnění. Tomu napovídá fakt, že AD a vaskulární demence mají mnoho podobných rizikových faktorů. Podle této teorie se AD rozvíjí ve vyšším věku a důsledkem vaskulárních rizikových faktorů. Poté dochází ke kritické mozkové hypoperfúzi, čímž je poškozena produkce endoteliálního oxidu dusnatého a vede ke kapilární degeneraci. Zásoby energie se sníží. Tato krize pak vyvolá patologie, které ovlivní syntézu proteinů, rozvoj plaků, protizánětlivou odpověď a synaptické změny vedoucí k AD²¹.

3.1.2.5 Další hypotézy

S rostoucím věkem dochází ke zvýšenému rozpadu myelinu v mozku. Demyelinizací je narušen axonální transport a funkce neuronů je poškozena. Další teorie tvrdí, že železo uvolněné při rozpadu myelinu může způsobovat další škody. Homeostatický proces opravy myelinu přispívá k rozvoji depozit β -amyloidu a tau proteinu¹³.

Podle oxidační stresové hypotézy je právě oxidační stres jedna z prvních událostí v patogenezi AD a hraje tak významnou roli při tvorbě AD patologie. Oxidačním stresem se rozumí nerovnováha mezi biochemickým procesem vedoucím ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a sloučenin zodpovědných za odstraňování těchto

forem. Za fyziologických podmínek je produkce ROS normální následkem buněčných procesů, které jsou řízeny antioxidanty. Avšak jakmile hladina ROS překročí antioxidační kapacitu (následkem chorobného stavu, vyššího věku nebo jiného důvodu), dochází k oxidačnímu stresu²². Oxidační poškození se projeví v lipidech, proteinech, nukleových kyselinách i cukrech. Všechny tyto sloučeniny jsou esenciální pro správně fungující neurony²³.

3.1.3 Léčba AD

V současné době je dostupná léčba pouze symptomatická, mezi léčiva prokazatelně zpomalující průběh choroby patří:

- 1) Inhibitory cholinesteráz
- 2) Inhibitory NMDA receptoru

3.1.3.1 Inhibitory cholinesteráz

V současné době jsou dostupné 3 inhibitory cholinesteráz (IChE) - rivastigmin, donepezil a galantamin. Prvním schváleným IChE byl takrin. Ten byl ale z léčby AD vyřazen, protože zvyšoval hodnoty jaterních enzymů u 40 - 50 % pacientů. Následoval donepezil, rivastigmin a posledním byl galantamin²⁹.

IChE můžeme klasifikovat podle selektivity pro AChE nebo BuChE. Takrin a rivastigmin inhibují oba enzymy, zatímco donepezil a galantamin specificky inhibují pouze AChE. Nebo také podle toho, jsou-li reverzibilními inhibitory (takrin, donepezil, galantamin) nebo pseudo-ireverzibilními inhibitory (rivastigmin)³⁰.

Léčba IChE vychází z cholinergní hypotézy. Účinnost těchto léků je potvrzena řadou randomizovaných studií. Indikací pro IChE je lehké až středně těžké stádium AD. Jejich užíváním se výrazně prodlouží období, kdy se o sebe pacient dokáže postarat sám. Zlepšují tak kvalitu pacientova života³¹.

Inhibiční aktivita IChE zvyšuje množství synaptického ACh. Ten je poté dostupný pro muskarinové a nikotinové cholinergní receptory stimulované jak centrálně, tak periferně. Centrální inhibice je nezbytná pro zvýšení kognitivních funkcí,

zatímco periferní blokáda zapříčiňuje jejich nežádoucí účinky. Tyto nežádoucí účinky jsou pak závislé hlavně na dávce²⁹.

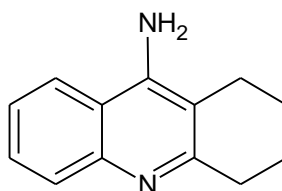
Léčba IChE je rozdělena do dvou fází. V první fázi se postupně zvyšuje dávka až do té doby, než je dosažen klinický účinek nebo do maximálně tolerované terapeutické dávky (tzv. eskalační léčba). Ve druhé fázi se léčba udržuje do dosažení maximální účinné dávky (tzv. udržovací léčba). S léčbou je spojen i výskyt nežádoucích účinků³². Pokud je lék podán orálně, je absorbován přes gastrointestinální stěnu a léčivo v plazmě dosáhne maximální koncentrace (c_{max}). Hladina léčiva poté postupně klesá, až je nejnižší (c_{min}). Větší a častější výkyvy léčiva v plazmě jsou pak spojeny s vyšším výskytem nežádoucích účinků³³. Mezi ně patří gastrointestinální obtíže, jako je nevolnost, zvracení, průjem, bolest břicha a nechutenství. Těmto problémům lze předejít nebo je zmírnit tím, že se dávka bude titrovat postupně. Opatrnosti je třeba u pacientů s poruchou srdečního rytmu, užívajících beta blokátory a digoxin. Dále u pacientů s anamnézou astmatu, chronické obstrukční plicní nemoci a vředové choroby. Důsledkem nežádoucích účinků může být narušena compliance pacienta vedoucí až k ukončení léčby. V praxi je proto důležitá bezpečnost a dobrá tolerance pacientem. Je tedy potřeba zvážit možné lékové interakce a poměr přínosu a rizika pro konkrétního pacienta³².

Takrin

Tetrahydroaminakridin neboli takrin (Obr. 1) byl v roce 1993 schválen jako první specifický lék v léčbě AD. Je centrálně aktivním nekompetitivním reverzibilním inhibitorem AChE a BuChE³⁴.

Takrin je metabolizován v játrech cytochromem P450 isoformou 1A2, jeho 5 hlavních metabolitů bylo analyzováno v moči a séru. Takrin interaguje s cimetidinem, při současném podávání se koncentrace takrinu zvyšovala³⁵. Reaktivní metabolity podléhají konjugaci. Přítomnost genetické poruchy glutathion S-transferázy zvyšuje riziko hepatotoxicity³⁶.

Právě časté abnormality funkce jater a hepatotoxicita vyžadovaly týdenní monitorování funkce jater. To spolu s nutností užívat lék 4 krát denně limitovalo jeho klinické užití a vedlo k méně toxickým, selektivnějším a účinnějším IChE³⁴.



takrin

Obr. 1 - Vzorec takrinu

Donepezil

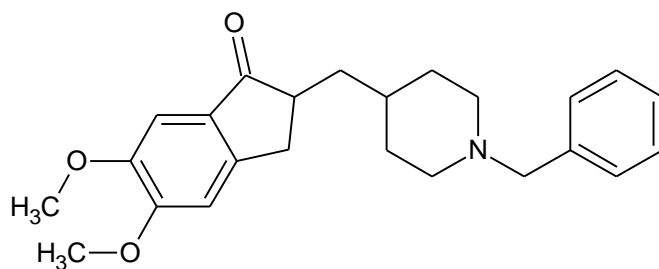
Donepezil (Obr. 2) byl schválen pro léčbu AD v roce 1997. Jedná se o piperidinovou bázi s vysokou selektivitou pro AChE³⁷.

Vstřebávání donepezilu není ovlivněno potravou. Je vysoce vázán na plazmatické bílkoviny a to až z 96 %. Jeho poločas je 70 hodin, u starších pacientů může být i delší. To umožňuje podávání léku pouze jednou denně³⁸.

K dispozici jsou tablety s okamžitým uvolňováním (5 mg nebo 10 mg), s prodlouženým uvolňováním (23 mg) a tablety dispergovatelné v ústech (5 mg nebo 10 mg). Doporučená denní dávka pro tablety s okamžitým uvolňováním je první 4 týdny 5 mg denně. Následně se zvyšuje na 10 mg denně. Tablety s prodlouženým uvolňováním poskytují vyšší jednodenní dávku, aniž by docházelo k prudkému nárůstu koncentrace. Orálně dispergovatelné tablety jsou výhodné pro pacienty, kteří mají problémy s polykáním tablet³⁹.

Donepezil podléhá po perorálním podání intenzivnímu first-pass metabolismu. V játrech je metabolizován cytochromem P450 isoformou 2D6 a 3A4³⁸. Léčivo a jeho metabolity jsou vylučovány primárně močí. Renální exkrece zahrnuje nezměněné léčivo, glukuronidované metabolity a produkty hydrolýzy. Fekální eliminace hydroxylovaných metabolitů a produktů N-oxidace hrají jen minoritní roli⁴⁰.

Donepezil je poměrně dobře snášen, jeho gastrointestinální nežádoucí účinky jsou většinou mírné a vyskytují se převážně jen ve fázi eskalační. Obvykle s pokračující terapií pomíjí a zřídka vedou k přerušení léčby³⁸.



donepezil

Obr. 2 - Vzorec donepezilu

Rivastigmin

Rivastigmin (Obr. 3) je karbamátový derivát, který reverzibilně inhibuje jak AChE, tak BuChE preferenčně v CNS. K dispozici je ve formě tobolek, perorálního roztoku⁴¹ a od roku 2007 i ve formě transdermálních náplastí⁴².

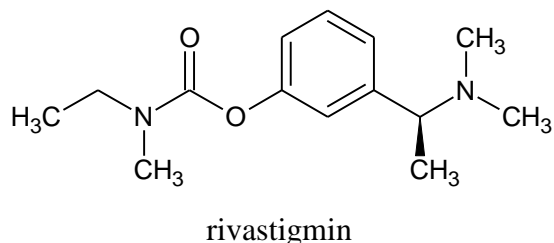
Přes jeho krátký plazmatický poločas (1,5 hodiny) se váže na enzym a inaktivuje ho na 10 hodin. To proto, že se rozpadá mnohem pomaleji než ACh. Tato pseudo-ireverzibilní inhibice pak vysvětluje, proč inhibice ChE v mozku trvá mnohem déle, než je krátký plazmatický poločas léčiva.

Rivastigmin je metabolizován svými cílovými enzymy. AChE i BuChE ho hydrolýzou přeměňují na neaktivní metabolity, které jsou vyloučeny močí⁴¹. Rivastigmin je tedy jen minimálně metabolizován jaterním cytochromem P450, což vylučuje interakce s léčivými metabolizovanými tímto enzymem.

Léčba perorálně podávaným léčivem je zahájena dávkou 1,5 mg 2 krát denně minimálně po dobu 2 týdnů. Pokud je dobře tolerována, titruje se až na dávku 6 mg 2 krát denně. Maximální dávka pro pacienta je 12 mg denně, která se podává po jídle (ráno a večer). Tím se minimalizují nežádoucí účinky⁴³. Výskyt nežádoucích účinků se z klinických studií jeví méně příznivě pro rivastigmin než pro donepezil a galantamin. Komplikací je také ztráta váhy, což je velkým problémem u slabých pacientů, kde není další úbytek na váze žádoucí³⁸.

Právě pro časté nežádoucí účinky byl rivastigmin schválen ve formě transdermálních náplastí. Léčba se zahajuje dávkou 4,6 mg za 24 hodin. Je titrována až na 9,5 mg za 24 hodin, což je doporučená denní udržovací dávka⁴². Náplasti jsou tvořeny matricovým systémem, který obsahuje léčivo, polymerní směs a adhezivní vrstvu. Tím je umožněno řízené uvolňování léčiva difúzí z matrice. Náplasti mají

podobnou účinností jako nejvyšší denní dávka perorálně podaného rivastigminu s výrazně lepší snášenlivostí (a to až o dvě třetiny). Denní aplikace náplasti umožňuje snadnější léčebný režim, lepší manipulaci a dodržování léčby. To přispívá k větší klinické účinnosti. Jen vzácně se projevuje podráždění kůže⁴⁴.



Obr. 3 - Vzorec rivastigminu

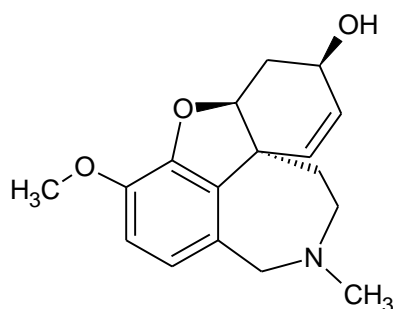
Galantamin

Galantamin (Obr. 4) je jedinečný v tom, že zvyšuje cholinergní funkce dvojitým mechanismem účinku. Kromě toho, že inhibuje AChE, působí také jako alosterický modulátor nikotinových receptorů. Alostericky se váže na jiné místo než ACh. To způsobí konformační změnu na receptoru, vedoucí k zesílení aktivity nikotinového receptoru v reakci na ACh. Tento duální farmakologický mechanismus zvyšuje funkci ACh³⁸.

Experimentální studie galantaminu začaly v Bulharsku a Sovětském svazu již během studené války. Poprvé byl izolován v roce 1952 z *Galanthus woronowii*. Tím odstartovalo jeho farmakologické zkoumání vedoucí ke zjištění četných biologických aktivit. Jeho hlavní indikací ve východním bloku byla polomyelitida. První sůl galantaminu – Nivalin byla od roku 1958 dostupná v injekční formě a od roku 1984 ve formě tablet. V roce 1980 byla v západní Evropě objevena schopnost galantaminu pronikat hematoencefalickou bariérou a zvyšovat cholinergní funkce. To vedlo ke klinickému vývoji v léčbě AD a v roce 2000 byl schválen pro léčbu AD v prvních zemích³.

Galantamin je po perorálním podání 100 % biologicky dostupný. Současné podávání jídla má jen malý vliv na absorpci. Oddálí pouze rychlost, neovlivní rozsah absorpce³⁸. Jeho vazba na plazmatické bílkoviny je nízká a hlavní cestou metabolismu jsou játra, v nichž dochází k metabolizaci enzymy CYP2D6 a CYP3A4³⁰. Při současném podávání inhibitorů tohoto enzymu dochází ke zvyšování koncentrace

galantaminu v plazmě. Doporučená počáteční dávka je 4 mg dvakrát denně. Dávka je postupně zvyšována až na udržovací dávku 16 – 24 mg denně rozdělenou do 2 dávek⁴⁵.



galantamin

Obr. 4 - Vzorec galantaminu

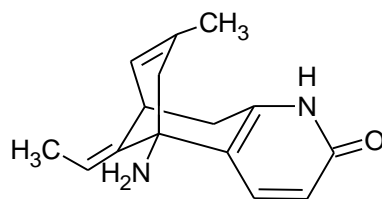
Huperzin A

Seskviterpenový alkaloid Huperzin A (HupA) (Obr. 5) je hlavní bioaktivní sloučeninou izolovanou z *Huperzia serrata* z čeledi Lycopodiaceae. V tradiční čínské medicíně je využívána již dlouhou dobu ke zmírnění problémů se ztrátou paměti, k léčbě horečky a zánětu a také na podporu krevního oběhu⁷³.

HupA je reverzibilní selektivní inhibitor AChE s mnohostrannými farmakologickými účinky. Ukazuje se, že kromě inhibice AChE, má i noncholinergní účinky. K těm patří protektivní efekt HupA na neurony, u kterých β - amyloid způsobil oxidativní poškození a mitochondriální dysfunkci. Dále up-regulace nervového růstového faktoru a antagonistický efekt N-methyl-D-aspartátového receptoru. Další studie ukazují, že také redukuje akumulaci železa v mozku.

Významně zpomalující proces neurální smrti podporuje využití HupA jako léku u AD a jiných neurodegenerativních onemocnění⁷⁴.

HupA je v Číně schválen pro indikaci AD a v USA je ve 3. fázi klinické studie, přičemž výsledky 2. fáze klinické studie ukazují, že je dobře tolerován až do dávky 0,4 mg dvakrát denně. Mohl by být významným přínosem pro pacienty, kteří netolerují nynější IChE⁷³.



huperzin

Obr. 5 - Vzorec huperzinu

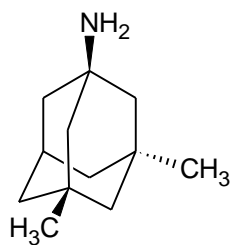
3.1.3.2 Inhibitory NMDA receptorů

Memantin

Memantin (Obr. 6) je nekompetitivní antagonist se středně silnou afinitou k NMDA receptorům. Má tedy odlišný způsob účinku než IChE a je indikován k léčbě středně těžké a těžké AD⁴⁶.

NMDA receptory zprostředkovávají rychlý excitační synaptický přenos v CNS. Jejich ligandem řízený kanál je propustný pro monovalentní a bivalentní ionty⁴⁷. Během AD se nadměrně uvolňuje glutamát a tím dochází k větší aktivitě NMDA receptorů. Vápenaté ionty pronikají ve větší míře do buněk a způsobují toxicitu a neurální smrt. Memantin poskytuje dostatečnou blokádu zmírňující tento proces⁴⁸.

Memantin je dobře snášen. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou průjem, nevolnost, bolesti hlavy a halucinace⁴⁷.



memantin

Obr. 6 - Vzorec memantinu

3.2 Čeleď Amaryllidaceae

Říše:	Rostliny (Plantae)
Podříše:	Cévnaté rostliny (Tracheobionta)
Oddělení:	Krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída:	Jednoděložné (Liliopsida)
Řád:	Chřestotvaré (Asparagales)
Čeleď:	Amarylkovité (Amaryllidaceae)

Amarylkovité rostliny přitahují pozornost a při jejich studiu byly objeveny různé účinky. Popsán je efekt protinádorový, protizánětlivý, antibiotický, antivirový a antimalaritický. Působí také na imunitní systém, centrální nervový systém a inhibují ChE.

V čeledi Amarylkovitých se vyskytuje kolem 130 rodů a více než 1300 odrůd rozptýlených v tropickém, subtropickém i mírném pásu⁴⁹.

Jsou to vytrvalé, většinou suchomilné rostliny s oddenkem, hlízou nebo cibulí⁵⁰. Jejich listy jsou čárkovité a mohou být buď přízemní, nebo rozmístěné po celé délce stonku⁵¹. Většinou je však stvol holý a nese oboupohlavný květ. Pro svůj nápadný a často zářivě barevný a voňavý květ jsou hojně okrasně pěstovány⁵⁰.

3.2.1 Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů

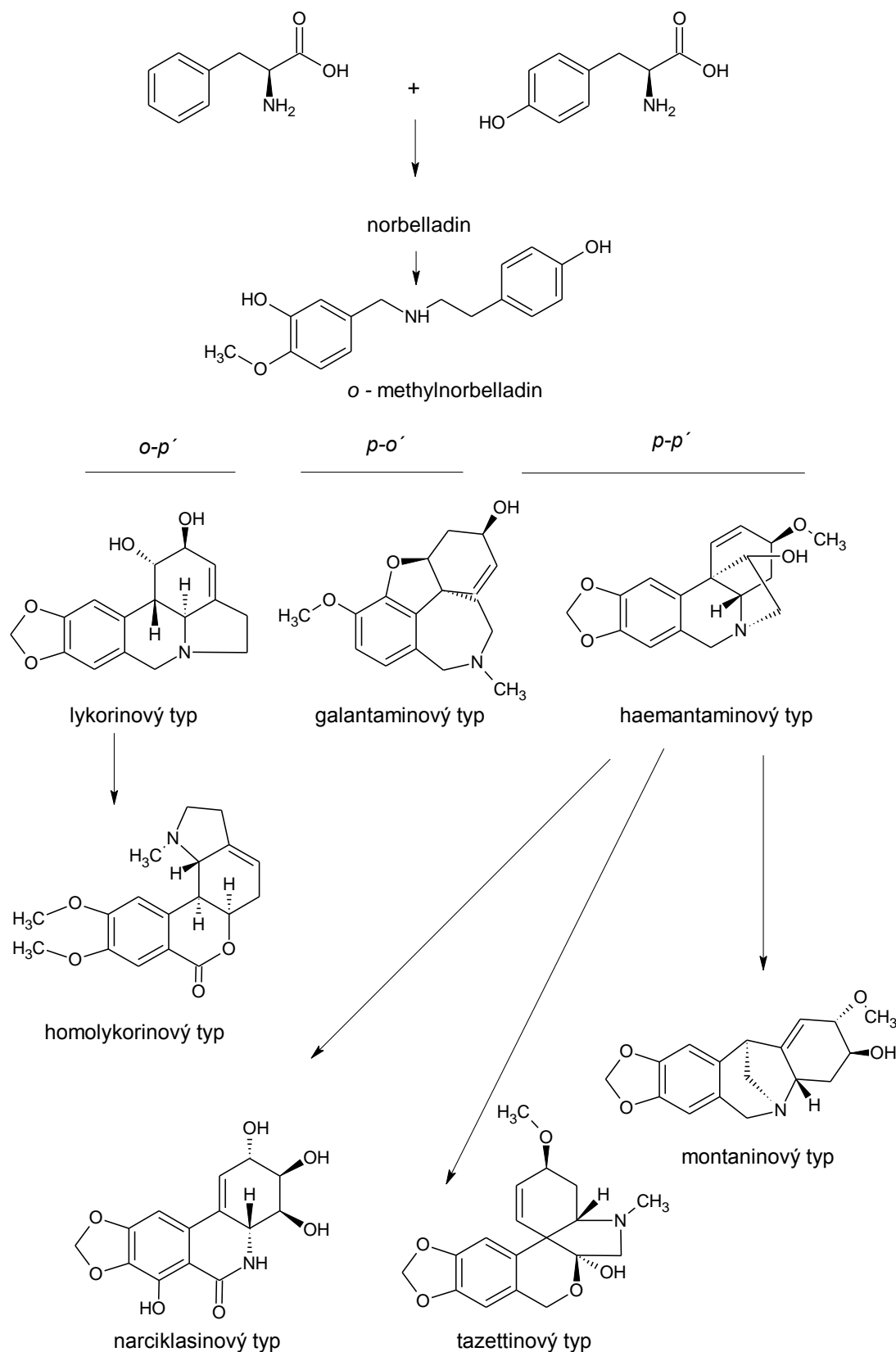
Amarylkovité alkaloidy jsou deriváty aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu, které produkují společný prekurzor *O*-methylnorbelladin.

Fenylalanin je fenylalaninamoniaklyasou (PAL) přeměněn na kyselinu skořicovou a amoniak. Tyrosin je dekarboxylován tyrosin dekarboxylasou na tyramin. Kyselina skořicová je degradována na aldehyd a jeho kondenzací s tyraminem vzniká Schiffova base, jejíž redukcí vzniká norbelladin.

Různými způsoby oxidace fenolu jsou produkovány hlavní strukturní typy alkaloidů. Enzymatickými reakcemi, kdy jeden alkaloid slouží jako prekurzor pro jiný typ alkaloidu, vzniká spektrum sloučenin. To, jaký alkaloid bude vznikat a v jaké koncentraci, se liší. Závisí na druhu, kultivaru, rozdílném množství biosyntetických

enzymů a také tkáních, kde daný alkaloid vzniká. Proto amarylkovité rostliny vytváří směs alkaloidů s dominantními sloučeninami a také s velkým množstvím sloučenin v nižších koncentracích⁵².

Mezi hlavní amarylkovité alkaloidy patří typ lykorinový, galantaminový, haemanthaminový, krininový, homolykorinový, narciklasinový, tazettinový a montaninový⁵³.



Obrázek 7 - Syntéza *Amaryllidaceae* alkaloidů norbelladinovou cestou⁵³

3.2.2 Typy amarylkovitých alkaloidů

3.2.2.1 Lykorinový typ

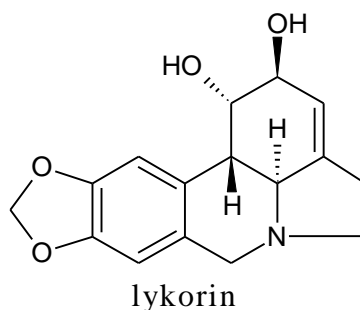
Hlavním zástupcem je lykorin (Obr. 7), nejčastěji se vyskytující alkaloid amarylkovitých⁵⁴. Byl prvním izolovaným alkaloidem této čeledi. Nachází se v rodech *Lycoris*, *Leucojum*, *Hymenocallis*, *Ammocharis*, *Brunsvigia* a *Crinum*.

Jedná se o pyrollofenanthridinový alkaloid vykazující mnohé farmakologické účinky, mezi něž patří efekt antivirový, antibakteriální, protizánětlivý a protinádorový. Mnoho studií naznačuje, že lykorin bude vhodným potenciálním protinádorovým léčivem. Indukuje apoptózu u nádorových buněk, inhibuje jejich proliferaci a má významnou inhibiční aktivitu vůči DNA topoizomeráze, která je nutná pro růst rakovinných buněk⁵⁵.

Lykorin má také antiprotozoální účinky na *Trichomonas vaginalis*. Působí tak, že zastavuje buněčný cyklus tohoto parazita⁵⁶. Také je účinný na *Plasmodium falciparum* způsobující malárii. Jeho výhodou je nízká toxicita a mírné nežádoucí účinky⁵⁵.

Lykorin má relativně slabou inhibiční aktivitu vůči AChE. Nejsilnější účinek vůči AChE má z lykorinových alkaloidů assoanin, který i tak vykazuje 4 krát nižší hodnotu než je referenční hodnota galantaminu⁵⁷.

Dalšími lycorinovými alkaloidy jsou například caranin, galantin, ungeremin, anhydrolykorin a dihydrolykorin⁵⁸.



Obr. 8 - Vzorec lykorinu

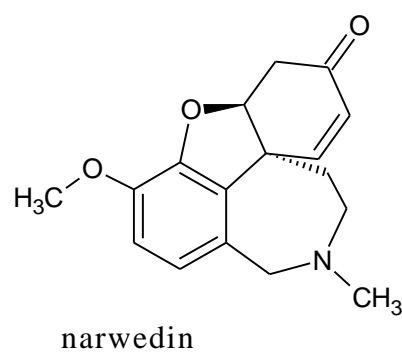
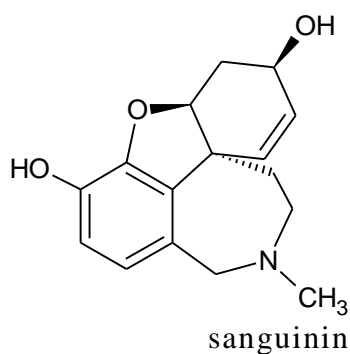
3.2.2.2 Galantaminový typ

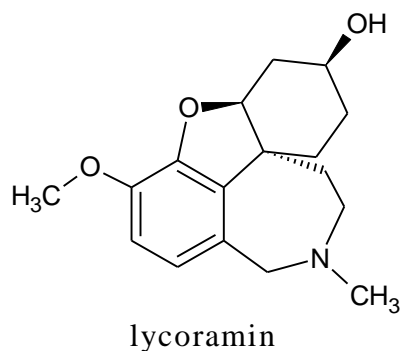
Galantamin, který byl poprvé izolován z *Galanthus woronowii*, je nyní získáván z rostlin *Narcissus* (kultivaru Carlthon), *Leucojum aestivum*, *Lycoris radiata* a *Ungernia victoris*⁵⁹.

Galantamin najdeme v mnoha dalších rodech jako *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Ungernia*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Zephyranthes*, *Hymenocallis* a *Haemanthus*⁶⁰.

Mezi další alkaloidy patří epigalantamin, narwedín, *N*-demethylgalantamin, lycoramín a sanguinín⁵⁸.

Při měření inhibiční aktivity AChE byla u sanguinínu zaznamenána až 10 krát silnější aktivita než u galantaminu. Větší inhibiční aktivita je dána přítomností hydroxyskupiny, která vytváří vodíkovou vazbu a přispívá tak k efektivnější vazbě na molekulu AChE. Dvojná vazba u dalších galantaminových alkaloidů je nejspíše důvodem jejich nedostatečné inhibiční aktivity. Znemožňuje totiž stejnou prostorovou konformaci, jakou mají aktivnější alkaloidy⁵⁷.

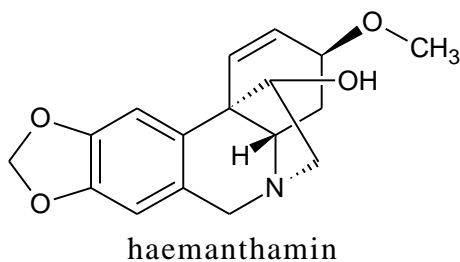




Obr. 9 - Vzorce derivátu galantaminu

3.2.2.3 Haemanthaminový a krininový typ

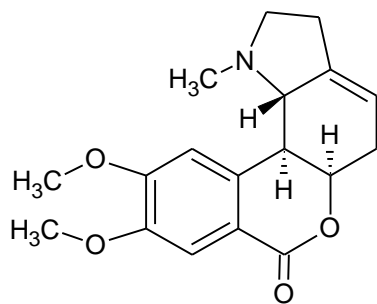
Haemanthamin (obr. 9), haemanthidin, crinamin, papyramin a maritidin jsou ethanofenanthridinovými deriváty se silným inhibičním účinkem proti růstu různých rakovinných buněk. Haemanthamin a haemanthidin také působí proti *Plasmodium falciparum*⁶¹.



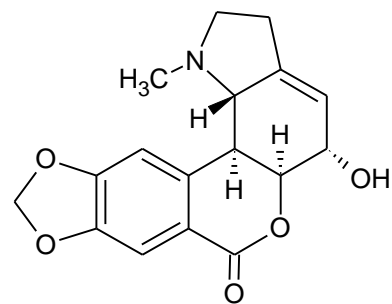
Obr. 10 - Vzorec haemanthaminu

3.2.2.4 Homolykorinový typ

Přeměnou alkaloidů lykorinového typu vznikají homolykorinové deriváty. Jsou odvozeny od 2-benzopyran[3,4-g]indolu⁶¹ a byla u nich prokázána cytotoxická a antiretrovirová aktivita. Jejich zástupcem je homolykorin, 8-*O*-demethylhomolykorin, hippeastrin⁵⁸ a lykorenin⁶¹.



homolykorin



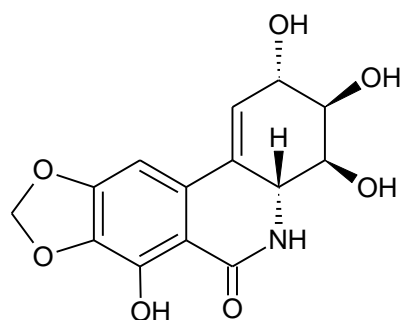
hippeastrin

Obr. 11 Vzorec homolykorinu a hippeastrinu

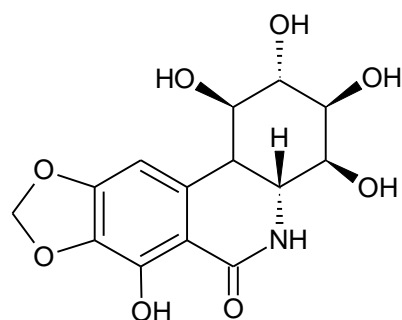
3.2.2.5 Narciklasinový typ

Do této skupiny alkaloidů patří narciklasin, pancratistatin a lycoridin⁶².

Narciklasin byl poprvé izolován z cibulí narcisů. U ostatních druhů je jeho obsah poměrně nízký, proto narcisy stále zůstávají jeho hlavním zdrojem⁶³. Později byl izolován pancratistatin z cibulí *Hymenocallis littoralis*. Brzy na to byla zjištěna cytotoxická aktivita těchto alkaloidů a jejich schopnost inhibovat proliferaci mnoha lidských rakovinných buněk. Selektivně indukují apoptózu spojenou s mitochondriální destabilizací a následně zvýšeným množstvím kyslíkatých reaktivních sloučenin⁶⁴. Jejich velkou výhodou je selektivita k nádorovým buňkám a jen minimální dopad na jiné než rakovinné buňky. Jsou tak potenciálním zdrojem pro budoucí generaci protinádorových léčiv⁶².



narciklasin



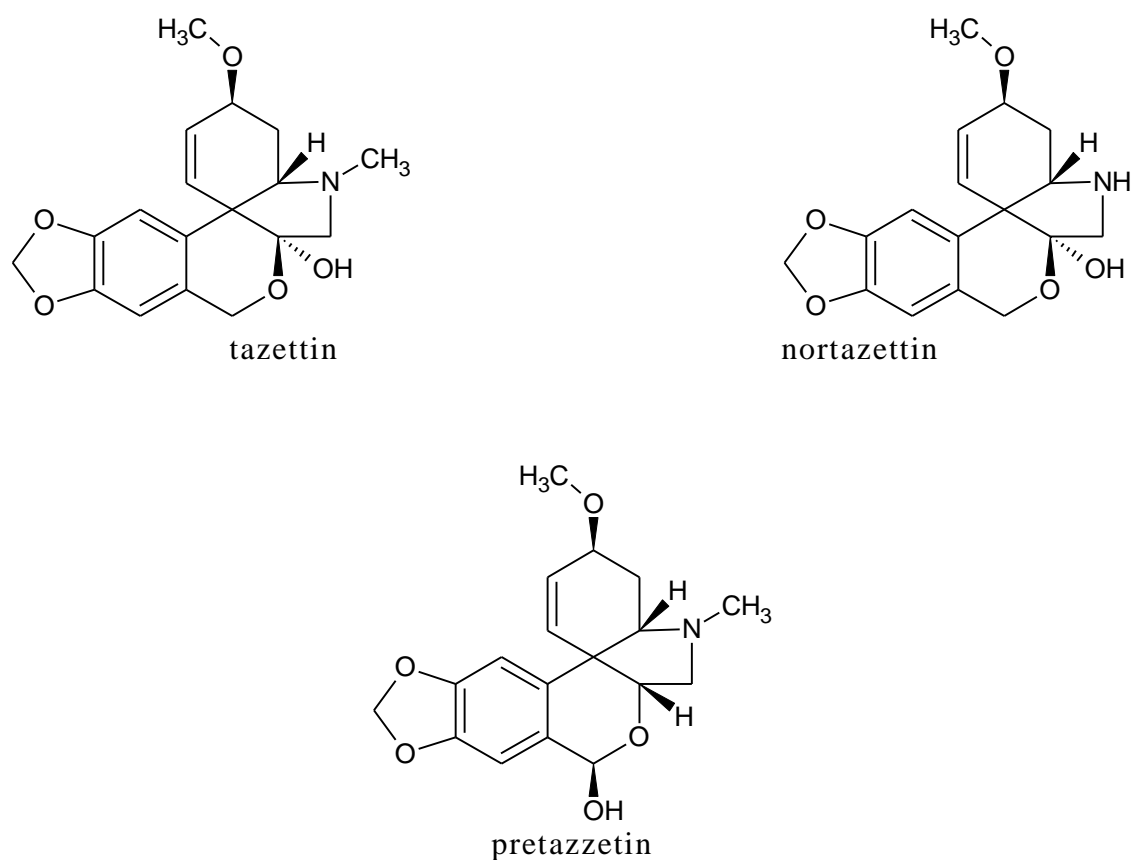
pankratistatin

Obr. 12 - Vzorec narciklasinu a pankratistatinu

3.2.2.6 Tazettinový typ

Mezi tazettinový typ alkaloidů patří tazettin, pretazettin, nortazettin (Obr. 12) a macronin⁵⁸.

Jsou to benzopyranoindolové deriváty s protinádorovou aktivitou⁶⁵. U hlavního zástupce tazettinu byla nalezena pouze mírná cytotoxická aktivita⁵⁸. Zájem je nyní především o pretazettin, který je prekurzorem tazettinu. Tazettin z něj vzniká přesmykem. Právě u něho byla pozorována aktivita proti celé řadě nádorových buněk⁶⁵.

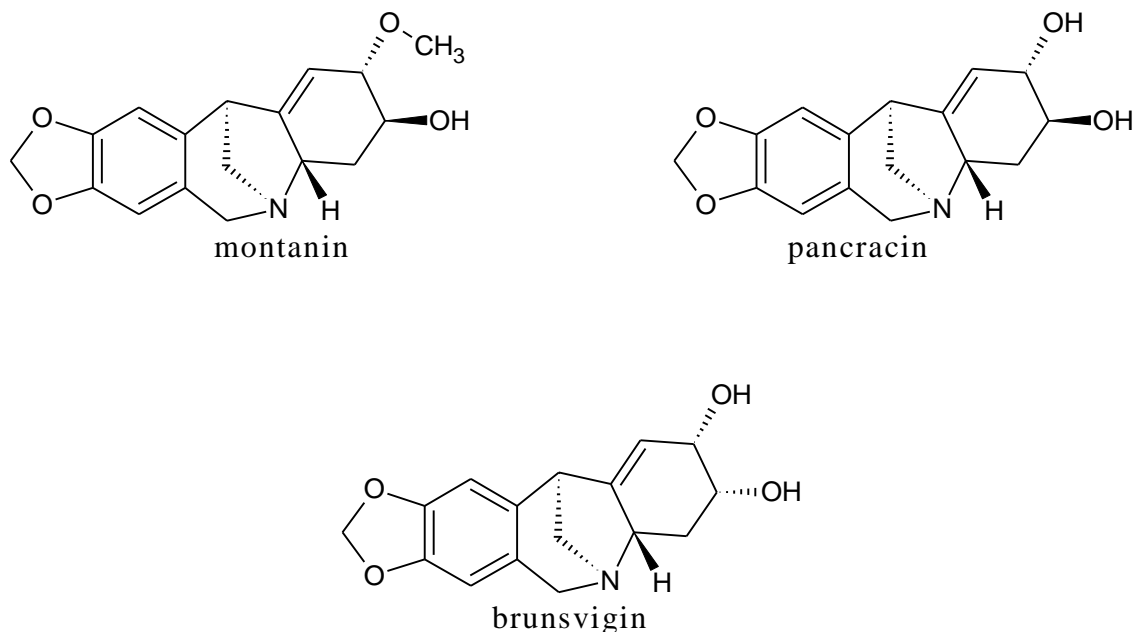


Obrázek 13 - Vzorec tazettinu a jeho derivátů

3.2.2.7 Montaninový typ

Tato malá skupina alkaloidů nesoucí pentacyklický 5,11-methanomorfanthridinový skelet má četné aktivity. Jako například efekt antikonvulzivní, antidepressivní a anxiolytický. Mají také slabý hypotenzní účinek⁶⁶.

Mezi tyto alkaloidy patří montanin, *o*-acetylmontanin brunsvigin, manthin, coccinin, a pankracin lišící se pouze polohou substituentů C2 a C3 na kruhu E⁶⁷. Tento typ se izoluje pouze v malé míře z několika druhů *Pancratinum* a *Narcissus*⁶⁸.



Obr. 14 – Vzorce montaninu a jeho derivátů

3.2.3 Rod *Narcissus*

Narcisy jsou vytrvalé rostliny a jejich rod obsahuje asi 80 - 100 druhů. Vyskytují se hlavně v jihozápadní Evropě a na severu Afriky. Několik druhů se rozšířilo i do Francie, Itálie a východního Středomoří. Rostou v oblasti nížin, ale i v horských lokalitách. Můžeme je nalézt na pastvinách, březích řek, v lesích, křovinách a skalních štěrbinách⁶¹.

Narcisy mají velkou morfologickou variabilitu. Liší se barvou, velikostí, orientací a také vůní květu. Kvetou bíle, žlutě a oranžově⁶⁹ většinou na začátku jara. Krátce po odkvětu listy stárnou a rostlina přechází do letní podzemní periody, kdy si cibule narcisů zachovávají vlhkost a alkaloidy v nich obsažené je pomáhají chránit před predátory. Některé druhy, jako například *N. elegans* (Obr. 14), *N. serotinus*, *N. viridiflorus* a *N. humilis*, kvetou na podzim. Jejich květ je ale malý a méně výrazný⁷⁰.



Obr. 15- *Narcissus elegans*⁸³

Složitost a nestálost taxonomie tohoto rodu je daná velmi pestrá divokou populací narcisů, snadností, s jakou se vyskytuje přirozená hybridizace, a také jejich pěstováním a šlechtěním. Hybridizace, kdy vznikají kultivary ve většině případů větší a robustnější než přirozeně se vyskytující rostliny, jsou velmi populární. Tyto kultivary mohou být i potenciálním zdrojem galantaminu. Jejich výhodou oproti divoce rostoucím rostlinám je to, že produkce galantaminu není ovlivněna růstovými podmínkami a chemickým složením půdy⁷¹.

Narcisy byly pro svůj bohatý zdroj alkaloidů využívány již v tradiční čínské medicíně. *Narcissus poeticus* (Obr. 15) je například popsán i v bibli pro léčbu příznaků, které bychom v dnešní době popsali jako rakovinu. Hippocrates doporučil narcissus k léčbě děložního nádoru a Plinius pak v 1. st. n. l. použil *Narcissus poeticus* a *Narcissus pseudonarcissus* pro ten samý účel. Nyní je známo, že *Narcissus poeticus* obsahuje 0,012% antineoplastického narciklasu⁶¹. Je hlášeno i mnoho případů otrav, kdy byly cibule narcisu snědены v domnění, že jde o cibuli. Lykorin působí emeticky, eventuelně způsobuje kolaps nebo smrt paralýzou CNS. Po pozření cibulí se objevuje nevolnost, bolest žaludku, nauzea, zvracení a průjem. Při silnější otravě pak třesavka, křeče a paralýza⁷⁰.



Obrázek 16 - *Narcissus pseudonarcissus*⁸⁴

3.2.3.1 *Narcissus tazetta* (L.)

Jedná se o vytrvalou rostlinu kvetoucí od prosince do března s podzemní cibulí hnědé barvy. Listy jsou čárkovité, 1 – 2 cm široké, šedozelené barvy. Květ tvoří bílé korunní lístky a žlutá pakorunka. Plodem je tobolka, v průměru 1 - 1,5 cm dlouhá⁷².

Přírozně se vyskytuje v oblasti Středozemního moře a zasahuje až do Íránu. Je oblíbenou zahradní rostlinou, která je pěstována v řadě kultivarů po celém světě. Roste na okrajích lesů, loukách ale i na skalách a útesech do nadmořské výšky 890 m n. m.⁷⁵.

Nejvíce zastoupené alkaloidy stanovené pomocí GC/MS shrnuje následující tabulka:

Strukturní typ	Alkaloidy
Tazettinový	Tazettin
Homolykorinový	Homolykorin
Haemanthaminový	Haemanthamin
Lykorinový	Lykorin
Galantaminový	Galantamin

Tabulka 1 - izolované alkaloidy *Narcissus tazetta* (L.)¹



Obrázek 17 - *Narcissus tazetta*⁸⁵

3.2.3.2 *Narcissus jonquilla* (L.)

Narcissus jonquilla pocházející z jižního Španělska je nyní velmi rozšířenou rostlinou. Má úzké, tmavě zelené listy⁷⁹. Stvol nese až 5 žlutých květů, které mají v průměru 3 – 3,5 cm⁷⁰. Mají krátkou pakorunku a intenzivně voní. Kvetou od dubna do května⁷⁹.

Nejvíce zastoupené alkaloidy stanovené pomocí GC/MS shrnuje následující tabulka:

Strukturní typ	Alkaloidy
Galantaminový	Galantamin
	Lykoramin
Tazettinový	Tazettin
Haemanthaminový	Haemanthamin
Homolykorinový	Homolykorin

Tabulka 2 - izolované alkaloidy *Narcissus jonquilla* (L.)^{80,81,82}



Obrázek 18 - *Narcissus jonquilla*⁸⁶

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím čištěna. Byla provedena destilace komerčních rozpouštědel. Vždy bylo predestilováno maximálně 90 % objemu rozpouštědla a jednotlivé frakce byly jímány podle uvedené teploty varu.

Ethanolové a ethylacetátové extrakty byly odpařovány na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 s vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při teplotě do 40 °C.

Vzorky pro zjištění biologických aktivit byly rychle odpařovány na vodní lázni (při teplotě do 60 °C) v injekčních ampulkách (o objemu 5 ml) a v proudu filtrovaného vzduchu. Po odpaření rozpouštědel byly ampulky sušeny ve vakuu (10 mmHg, po dobu 24 hodin) v exsikátoru nad perlami silikagelu. Do ampulek byl napuštěn argon a následně byly zataveny. Do doby než bylo provedeno měření, byly ampulky uchovány při teplotě – 22° C.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla

Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný metanolem (Lihovar Kolín)

Ethylacetát, p.a. (Penta)

Methanol, LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

4.2.2 Chemikálie

Kyselina sírová 20%, p.a. (Penta)

Síran sodný bezvodý, čistý (Penta)

Uhličitan sodný 10%, bezvodý, čistý (Lachema a.s)

4.3 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza

4.3.1 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

Identifikace alkaloidů *Narcissus tazetta* (L.) a *Narcissus jonquilla* (L.) byla provedena za použití plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A s Triple-Axis hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C. Nástřik byl proveden při teplotě 280 °C (v objemu 1 µl a split v poměru 15:1). K dělení směsi byla použita kolona Agilent Technologies HP-5MS, 30 m x 0,250 mm. Měření probíhalo za teplotního programu 15 °C za minutu ze 100 °C na 180 °C, 1 minutu na 180 °C, 5 °C za minutu ze 180 °C na 300 °C a poté 40 minut na 300 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium (Linde), jehož průtoková rychlost byla 0,8 ml za minutu. Fragmenty, které byly detekovány při ionizaci 70 eV a teplotě 230 °C, byly v rozmezí 40 – 600 *m/z*.

Spektra identifikovaných alkaloidů byla porovnána se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), se standardy izolovanými v naší laboratoři a s daty v literatuře.

4.3.2 Příprava ethanolických a alkaloidních extraktů

Cibule narcisů byly rozemlety a extrahovány ethanolem. Droga byla 15 minut povařena pod zpětným chladičem a zfiltrována (vyvaření bylo provedeno dvakrát). Poté byl přidán ethanol a byla provedena sonikace na ultrazvukové lázni. Filtráty byly zfiltrovány přes křemelinu a poté bylo odpařeno rozpouštědlo. Po odpaření dosucha byl zbytek rozpuštěn ve 100 ml 2% H₂SO₄ a vytřepán diethyletherem (pro odstranění nežádoucích nealkaloidních látek). Kyselá vrstva byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH cca 10 a vytřepána 3krát ethylacetátem. Ethylacetátové výtřepky byly spojeny, byl přidán bezvodý síran sodný (2–5 g). Poté byly odpařeny dosucha na vakuové odparce a následně umístěny do exsikátoru. Z každého alkaloidního extraktu byl odebrán vzorek o hmotnosti cca 10 mg na biologické testy. Zbytek byl rozpuštěn v metanolu a byl připraven roztok o koncentraci 1 mg/ml pro GC/MS analýzu.

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

4.4.1 Chemikálie, pufrы a materiál pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Chemikálie

- 10mM roztok Acetylthiocholin jodidu (Sigma-Adrich)
- 10mM roztok Butyrylcholinjodidu (Sigma-Adrich)
- Dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Adrich)
- 5mM roztok 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Pufry

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4

Zásobní roztok A - 10mM roztok NaH_2PO_4

(obsahující 1,20 g NaH_2PO_4 , nebo 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 1 litru roztoku)

Zásobní roztok B - 10mM roztok Na_2HPO_4

(obsahující 1,42 g Na_2HPO_4 , nebo 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru roztoku)

→ Smíchalo se 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B a 300 ml vody

- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150mM chloridu sodného (8,766 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a bylo jím doplněno do 1000 ml)

- 100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A - 200mM roztok NaH_2PO_4

(obsahující 24,0 g NaH_2PO_4 , nebo 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nebo 31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru roztoku)

Zásobní roztok B - 200mM roztok Na_2HPO_4

(obsahující 28,4 g Na_2HPO_4 , nebo 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, nebo 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ v 1 litru roztoku)

→ Smíchalo se 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody

Materiál

- Pouzdra lidských erytrocytů – zdroj AChE
- Lidská plazma – zdroj BuChE

4.4.2 Podmínky měření

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

4.4.3 Přístroj pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

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

4.4.4 Příprava materiálu

Byla provedena centrifugace 2 ml citranu sodného a 18 ml krve (získané od zdravých dobrovolníků) po dobu 10 minut, při rychlosti 4000 rpm a teplotě 4 °C. Použita byla centrifuga Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Po centrifugaci byla odebrána plazma (ke stanovení BuChE). Po stanovení její absorbance byla před rozplněním do mikrozkušavek provedena filtrace přes vrstvu buničité vaty.

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu byl odsán a byl odečten objem erytrocytů ve 4 zkumavkách. Sediment byl poté zředěn 5mM fosfátovým puftrem pH 7,4 obsahujícím 150mM chloridu sodného a rozdělen do 8 zkumavek o objemu 13 ml. Byl

proveden stejný způsob centrifugace jako při oddělování plazmy. Odstranění zbytků plazmy bylo provedeno 3 krát. Poté byl přidán 5mM fosfátový pufr pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného do objemového poměru 1:9. Směs byla následně hemolyzována po dobu 10 minut za míchání na magnetické míchačce při 300 rpm. Ihned po skončení hemolýzy byla u suspenze stanovena aktivita AChE.

4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Hodnota IC₅₀ byla stanovena pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty byly použity estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno při vlnové délce 436 nm. Po navázání SH skupiny thiocholinu vzniklo žluté zbarvení a byl zaznamenán nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu programu GraphPaD Prism. Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ galantaminu a huperzinu A.

Procenta inhibice (% I) byla počítána dle vzorce:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$$

ΔA_{BL} nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

ΔA_{SA} nárůst absorbance měřeného vzorku

Do jamek mikrotitračních destiček bylo nepipetováno:

- Slepý vzorek

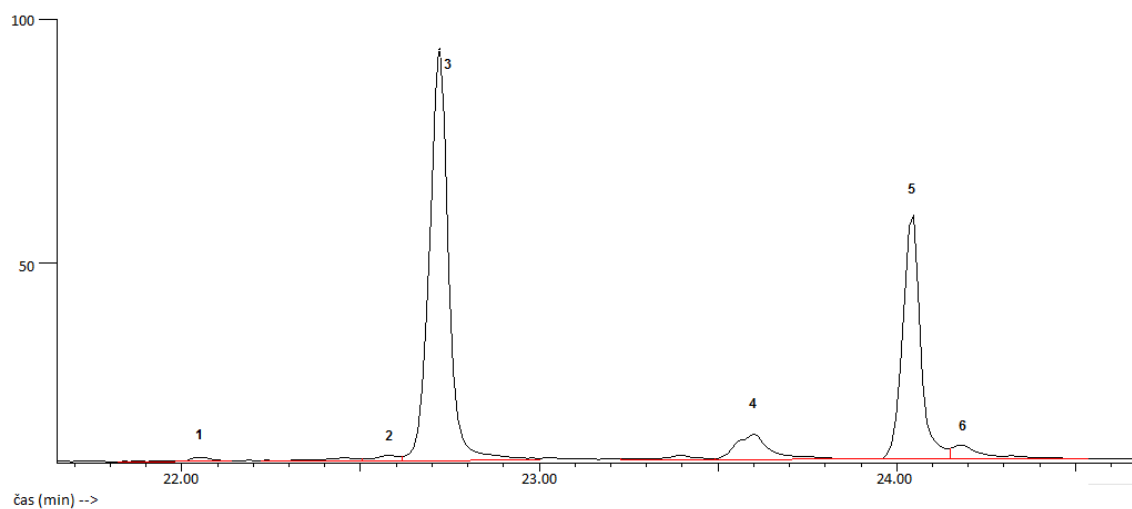
(8,3 μ l plazmy nebo pouzder lidských erytrocytů, přidalo se 67 μ l DTNB, 8,3 μ l rozpouštědla použitého pro ředění vzorku, 215 μ l 100mM fosfátového pufru a 33,5 μ l roztoku substrátu)

- Měřené extrakty

(použily se stejné objemy činidel a roztoku substrátu, ale místo samotného rozpouštědla se přidávaly roztoky extraktů o různé koncentraci - 20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml, případně nižší)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 GC/MS analýza *Narcissus tazetta* cv. Abba

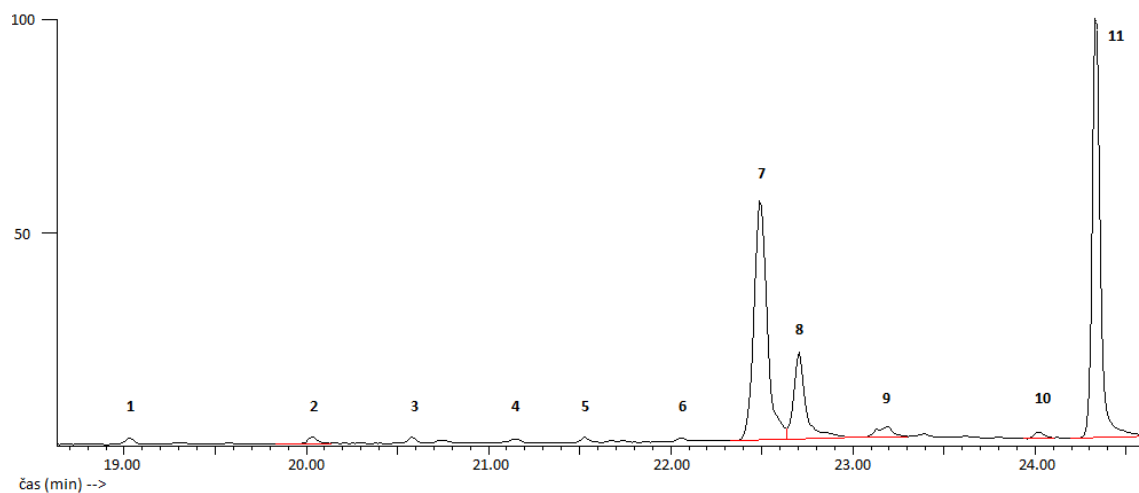


Obrázek 19 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus tazetta* cv. Abba

V tomto kultivaru byly identifikovány 3 alkaloidy. Dominovaly alkaloidy tazettinového typu – tazettin (3) a nortazettin (4). Zastoupen byl také lykorin (5). Další alkaloid (1), který měl nejmenší procentuálním zastoupením, se nepodařilo identifikovat. Složky 2 a 6 nebyly alkaloidního charakteru.

Alkaloidní extrakt tohoto kultivaru pro nás nevykazoval žádnou zajímavou inhibiční aktivitu.

5.2 GC/MS analýza *Narcissus tazetta* cv. Bridal crown

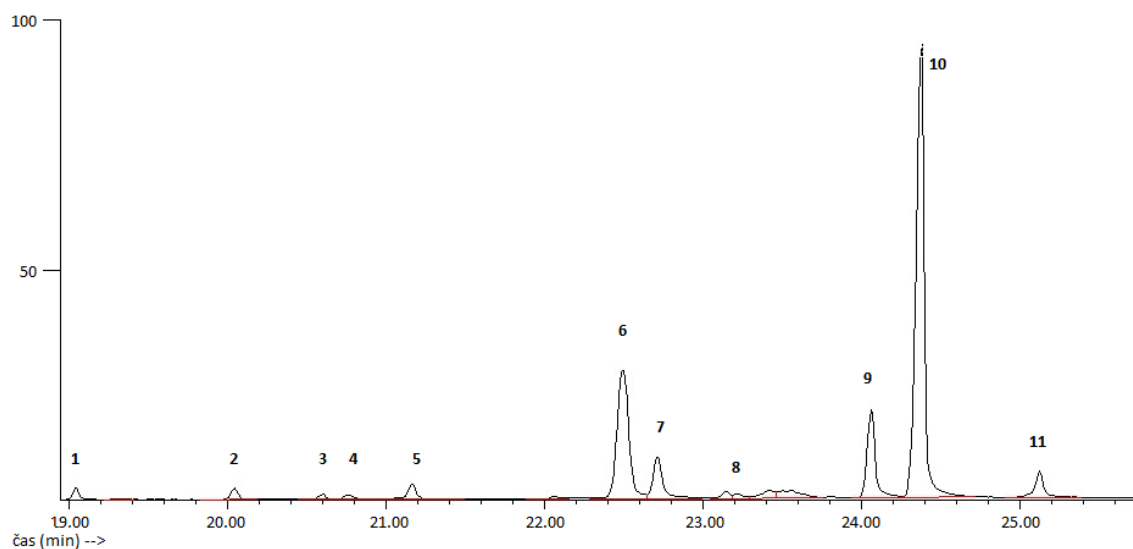


Obrázek 20 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus tazetta* cv. Bridal Crown

U tohoto kultivaru se podařilo identifikovat 8 alkaloidů. Největší zastoupení měl homolykorin (11). Ve vysokém procentu byl zastoupen i haemanthamin (7) a tazettin (8). V menším zastoupení byl přítomen pankracin (9), lykorin (11), cherylin (5), krinin (2) a galantamin (1). Zbývající alkaloidy se nepodařilo identifikovat, ale dva ze tří neidentifikovaných alkaloidů (3 a 4) patří zřejmě mezi krininový typ alkaloidů.

Inhibiční aktivita tohoto kultivaru byla podstatně vyšší než u předchozího kultivaru. Pro nás ale byla hodnota ($188,30 \pm 23,05 \mu\text{g/ml}$ vůči HuAChE, $280,22 \pm 25,89 \mu\text{g/ml}$ vůči HuBuChE) stále nezajímavou.

5.3 GC/MS analýza *Narcissus tazetta* cv. Cragford

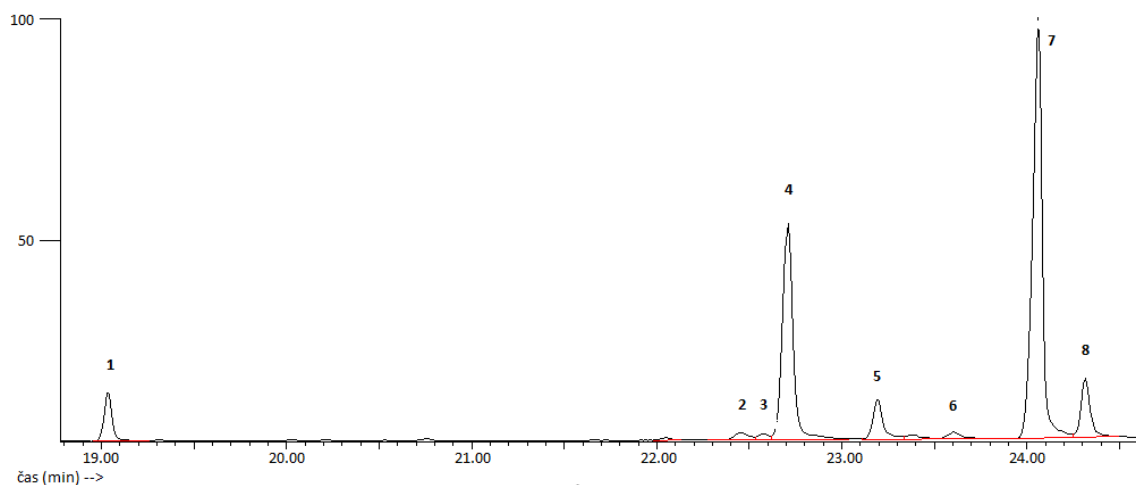


Obrázek 21 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus tazetta* cv. Cragford

V tomto kultivaru bylo identifikováno 9 alkaloidů. Dominantní byl opět homolykorin (10). Ve větším zastoupení byl přítomen také haemanthamin (6), lykorin (9) a tazettin (7). Podařilo se identifikovat další galantaminový alkaloid – chlidanthine, 1,2-dihydro- (11). Galantamin (1) byl také zastoupen. Z krininových alkaloidů byl přítomen krinin (2), maritidin (4) a stejně jako u předchozího kultivaru byly přítomny alkaloidy (3 a 5), které se nepodařilo identifikovat, ale jsou zřejmě krininového typu. Dalším alkaloidem byl pankracin (8).

I přes vyšší inhibiční aktivitu než u předchozích kultivarů, se pro nás hodnota stále nejevila zajímavou.

5.4 GC/MS analýza *Narcissus tazetta* cv. Falkonet

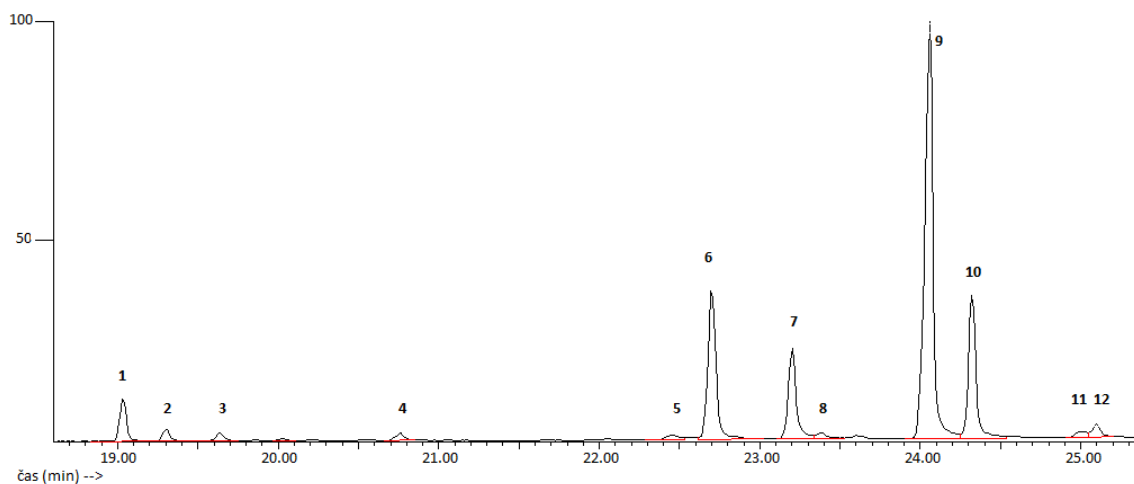


Obrázek 22 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus tazetta* cv. Falkonet

Tomuto kultivaru dominoval lykorin (7). Dalšími alkaloidy byly stejně jako u předchozích kultivarů tazettin (4), homolykorin (8) a pankracin (5). Galantamin (1) byl v nepatrně vyšším zastoupení. V nejmenší procentuální zastoupení byl přítomen nortazettin (6) a haemanthamin (2). Složka 3 nebyla alkaloidního charakteru.

Inhibiční aktivita tohoto kultivaru byla opět vyšší než u předchozích, což bylo zřejmě zapříčiněno vyšším zastoupením galantaminu. Nicméně hodnota $76,80 \pm 9,28 \mu\text{g/ml}$ vůči HuAChE pro nás stále nebyla dosti významnou.

5.5 GC/MS analýza *Narcissus tazetta* cv. Golden down

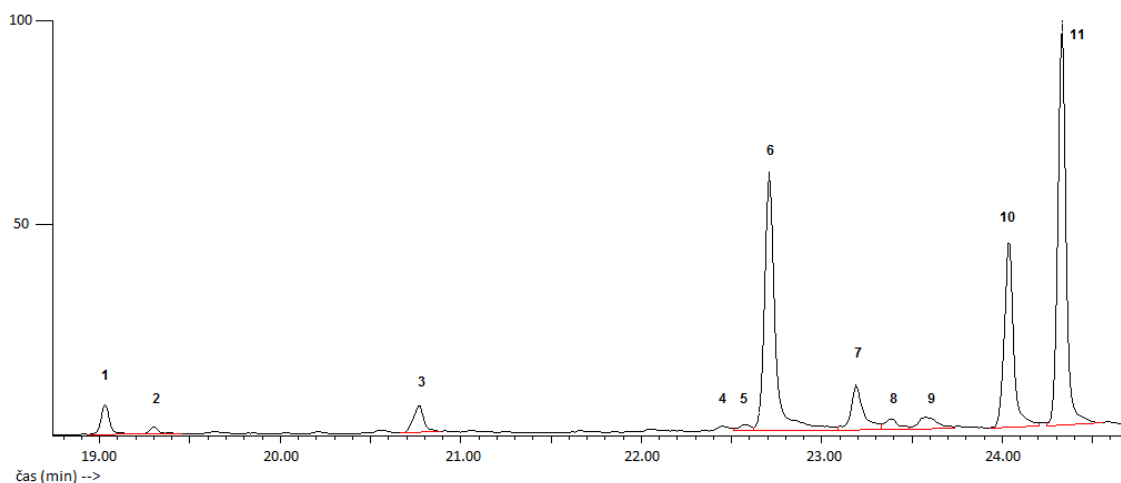


Obrázek 23 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus tazetta* cv. Golden down

9 alkaloidů se podařilo identifikovat v tomto kultivaru. Alkaloidem s nejvyšším procentuálním zastoupením byl lykorin (9). Přítomen byl opět také homolykorin (10), tazettin (6), pankracin (7) a galantamin (1). Stejně jako v kultivaru Cragford byl v nižším procentu zastoupen i maritidin (4) a chlidanthine, 1,2-dihydro- (11). V tomto alkaloidním extraktu byl také identifikován další galantaminový alkaloid – lykoramin (2). Další alkaloid (3) se nepodařilo identifikovat. Složky 8 a 11 nebyly alkaloidního charakteru.

Inhibiční aktivita tohoto alkaloidního extraktu vůči HuAChE byla druhou nejvyšší. Ale stejně jako u předchozích kultivarů pro nás nebyla zajímavou.

5.6 GC/MS analýza *Narcissus tazetta* cv. Hoopol

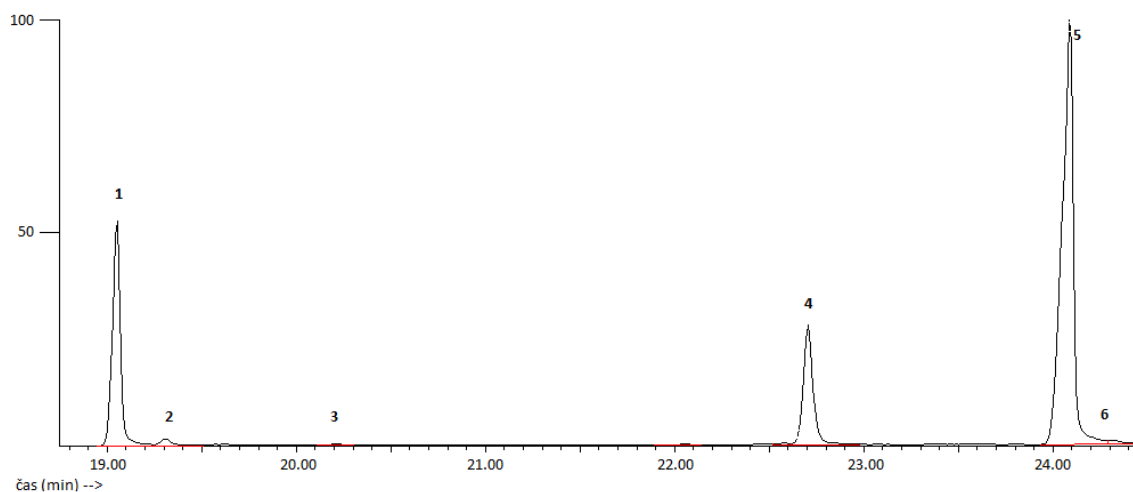


Obrázek 24 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus tazetta* cv. Hoopol

V tomto kultivaru se podařilo identifikovat 9 alkaloidů, z nichž nejvyšší procentuální zastoupení měl homolykorin (11), dále tazettin (6) a lykorin (10). V minoritnějším zastoupení byl přítomen pakracin (7), galantamin (1), maritidin (3), haemanthamin (4) a lykoramin (2). V tomto alkaloidním extraktu byl identifikován ještě další alkaloid lykorinového typu – galantin (9).

Inhibiční aktivita vůči HuAChE a HuBuChE nebyla ani v tomto kultivaru nijak vysoká.

5.7 GC/MS analýza *Narcissus jonquilla* cv. New baby



Obrázek 25 - Chromatografický záznam alkaloidního extraktu *Narcissus jonquilla* cv. New baby

V tomto kultivaru se podařilo identifikovat 6 alkaloidů. Nejvýše zastoupeným byl lykorin (5). V nejvyšším procentu ze všech kultivarů (23 %) byl přítomen galantamin (1). Byly identifikovány ještě další galantaminové alkaloidy – lykoramin (2) a narwedin (3). V malém procentu byl identifikován také homolykorin (6).

Inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE byly u tohoto kultivaru nejvyšší ze všech. Naměřená hodnota vůči HuAChE byla $13,78 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ a vůči HuBuChE $96,12 \pm 9,55 \mu\text{g/ml}$. Jak již bylo uvedeno, tento kultivar obsahoval nejvyšší procentuální zastoupení galantaminu ze všech a není tedy překvapením, že inhibiční aktivity dosahovaly nejvyšších hodnot.

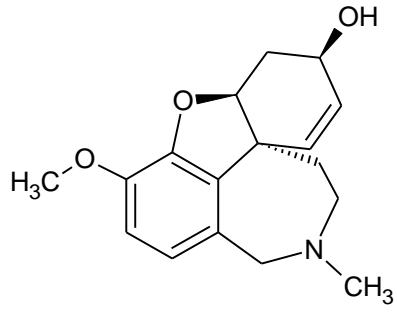
Všechny alkaloidní extrakty byly identifikovány na základě hmotnostních spekter, jejich porovnáním s údaji uvedenými v literatuře a také na základě retenčních časů jednotlivých složek.

Všechny identifikované alkaloidy shrnuje Tabulka 3. Inhibiční aktivity jednotlivých alkaloidních extraktů jsou více popsány v kapitole 5.8 a hodnoty vůči HuAChE a HuBuChE shnuty v Tabulce 4.

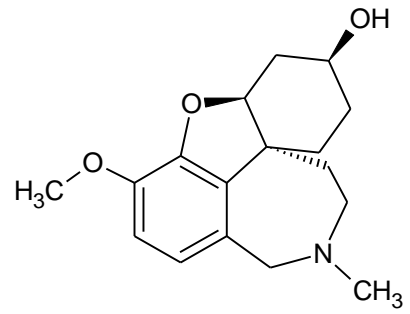
Sloučenina	Retenční čas (min)	[M+] a charakteristické ionty (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Abba (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Bridal crown (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Cragford (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Falkonet (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Golden down(%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Hoopol (%)	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. New Baby (%)
1 Galantamin	19,04	287(78), 286(100), 244(24), 230(12), 216(35), 174(30), 115(15)	< 1	1	5	4	4	23	
2 Lykoramin	19,31	289(63), 288(100), 274(4), 232(9), 202(11)				1	1	1	
3 Krinin	20,04	271(100), 254(13), 242(5), 228(25), 216(8), 199(60), 187(54), 173(20)	< 1	1					
4 Narwedín	20,22	285(75), 284(100), 242(25), 228(10), 216(25), 199(24), 174(30), 115(20)						< 1	
5 A1	20,59	325(5), 273(100), 230(25), 201(97), 189(56), 174(25), 128(16), 115(25), 56(28)	< 1	< 1					
6 Maritidin	20,77	287(100), 244(30), 215(80), 203(52), 189(23), 115(28)		< 1		1	4		
7 A2	21,16	327(4), 273(100), 254(11), 230(19), 201(85), 189(52), 175(31), 157(47), 128(18), 77(18), 44(28)	< 1	1					
8 Cherylin	21,54	285(35), 242(100), 241(87), 225(78), 211(60), 210(35), 197(8), 181(23)	< 1						

Sloučenina	Retenční čas (min)	[M+] a charakteristické ionty (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Abba (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Bridal crown (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Cragford (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Falkonet (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Golden down (%)	<i>Narcissus tazetta</i> cv. Hoopool (%)	<i>Narcissus jonquilla</i> cv. New Baby (%)
9 Haemanthamin	22,48	301(15), 272(100), 240(15), 257(13), 211(15), 181(23)	36	22	1	< 1	< 1		
10 Tazettin	22,71	331(33), 316(20), 298(21), 247(100), 225(23)115(20)	62	14	5	28	17	28	14
11 Pankracin	23,20	287(100), 270(20), 243(23), 223(18), 214(22), 199(30), 185(31)	3	< 1	5	10	5		
12 Galanthin	23,57	317(19), 298(10), 284(11), 268(23), 243(95), 242(100)						3	
13 Nortazettin	23,61	317(70), 284(60), 233(50), 201(64), 199(58), 181(59), 115(60), 56(30), 44(100)	6		1				
14 Lykorin	24,06	287(30), 286(22), 268(28), 250(20), 227(65), 226(100)	31	1	11	52	48	18	60
15 Homolykorin	24,34	207(4), 178(1), 110(8), 109(100), 108(22), 94(2), 82(3)	41	55	7	15	35	1	
16 Chlidanthine 1,2-dihydro-	25,12	289(30), 229(64), 228(100), 147(8), 111(9), 41(4)			3		2		

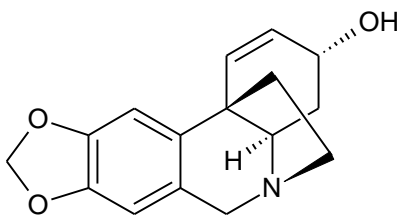
Tabulka 3 - Identifikované alkaloidy jednotlivých kultivarů *Narcissus tazetta* a kultivaru *Narcissus jonquilla*



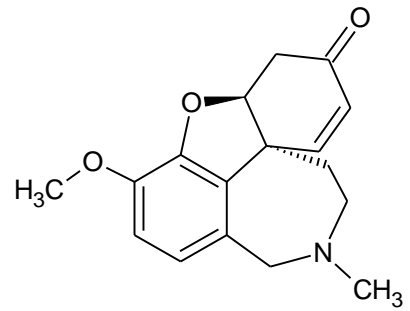
galantamin



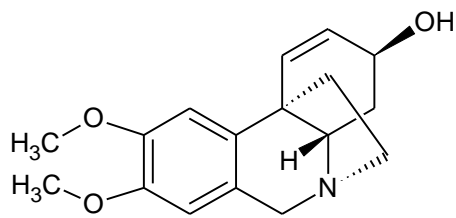
lykoramin



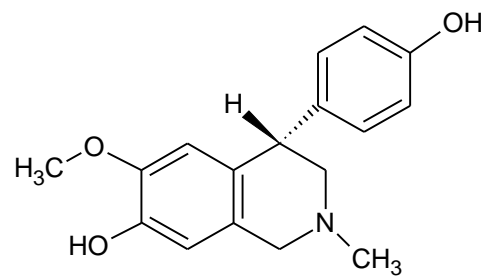
krinin



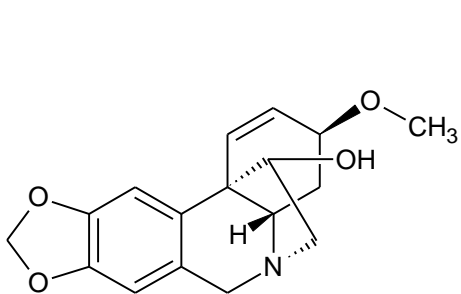
narwedidin



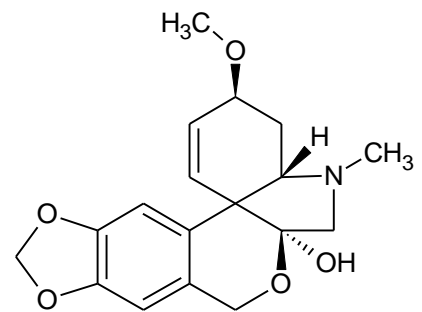
maritidin



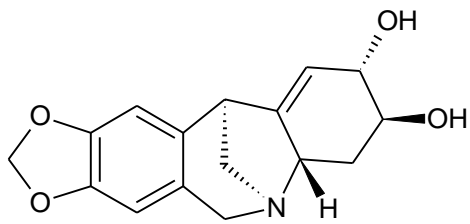
cherylin



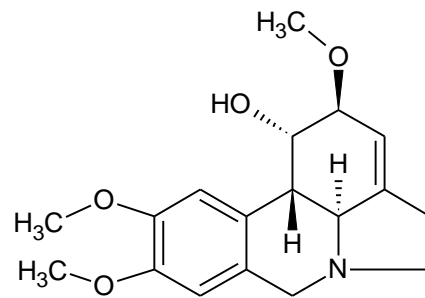
haemanthamin



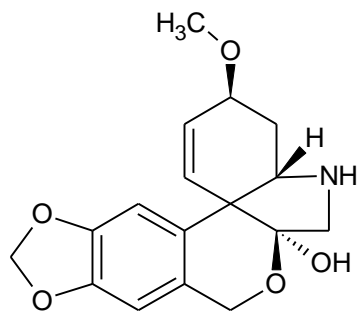
tazettin



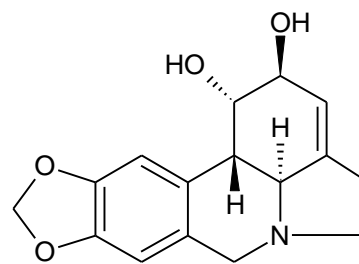
pankracin



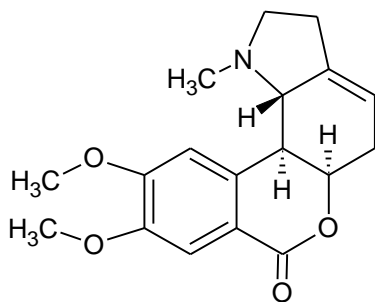
galantamin



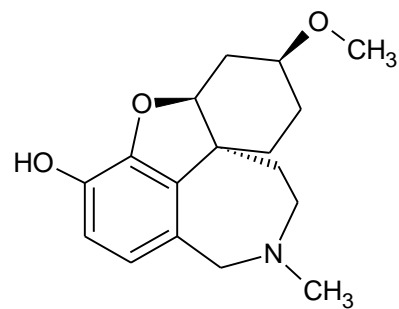
nortazettin



lykorin



homolykorin



chlidanthin, 1,2-dihydro-

Obrázek 26 - Vzorci identifikovaných alkaloidů

5.8 Biologická aktivita alkaloidních extraktů *Narcissus tazetta* a *Narcissus jonquilla*

Jak již bylo zmíněno, inhibiční aktivity jednotlivých kultivarů *Narcissus tazetta* vůči HuAChE a HuBuChE nebyly nijak zajímavé. Vůbec nejnižší aktivitu vůči HuAChE měl kultivar Abba, jehož hodnota byla $2152,17 \pm 425,84$ $\mu\text{g/ml}$. Důvodem takto slabé aktivity je nejspíše to, že u tohoto kultivaru jako jediného nebyl přítomen galantamin.

Studie ukazují, že největší inhibiční aktivitu vůči HuAChE má právě galantaminový a lykorinový typ alkaloidů⁷⁶.

Z galantaminového typu je oproti galantaminu až 10 krát aktivnější sanguinin⁷⁷, který však nebyl stanoven. Identifikovaným galantaminovým alkaloidem byl lykoramin. Jeho inhibiční aktivita je však velmi nízká⁷⁸.

Mezi silné inhibitory lykorinové typu patří 1-*O*-acetyllycorine, který má podobnou inhibiční aktivitu jako sanguinine. Samotný lykorin má jen velmi nízkou nebo žádnou aktivitu⁷⁷, stejně jako další identifikovaný lykorinový alkaloid – galantin⁷⁸.

Další alkaloidy – krinin, tazettin a cheryllin mají také slabou inhibiční aktivitu⁷⁷.

Nejvyšší inhibiční aktivitu z *Narcissus tazetta* měl kultivar Golden down s hodnotou $38,06 \pm 4,69$ $\mu\text{g/ml}$, která ale není nijak vysokou.

Nejslibnější inhibiční aktivitu ze všech naměřených vzorků měl *Narcissus jonquilla* kultivar New baby a to zřejmě proto, že u něj byl stanoven nejvyšší obsah galantaminu ze všech.

Ostatní naměřené inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE shrnuje následující tabulka:

Taxon	AChE	BuChE
<i>Narcissus tazetta</i> cv. Abba	2152,17 ± 425,84 µg/ml	590,98 ± 71,22 µg/ml
<i>Narcissus tazetta</i> cv. Bridal Crown	188,30 ± 23,05 µg/ml	280,22 ± 25,89 µg/ml
<i>Narcissus tazetta</i> cv. Cragford	93,18 ± 9,24 µg/ml	209,28 ± 23,33 µg/ml
<i>Narcissus tazetta</i> cv. Falkonet	76,80 ± 9,28 µg/ml	296,53 ± 37,65 µg/ml
<i>Narcissus tazetta</i> cv. Golden down	38,06 ± 4,69 µg/ml	111,40 ± 12,40 µg/ml
<i>Narcissus tazetta</i> cv. Hoopol	66,94 ± 7,27 µg/ml	141,37 ± 16,92 µg/ml
<i>Narcissus jonquilla</i> cv. New baby	13,78 ± 1,48 µg/ml	96,12 ± 9,55 µg/ml

Tabulka 4 - Inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE jednotlivých kultivarů *Narcissus tazetta* a kultivaru *Narcissus jonquilla*

6 Závěr

Materiálem pro tuto diplomovou práci byly cibule 6 kultivarů *Narcissus tazetta* a cibule 1 kultivaru *Narcissus jonquilla*, ze kterých byly připraveny alkaloidní extrakty. V rámci této diplomové práce byla u připravených alkaloidních extraktů provedena GC/MS analýza a byly změřeny inhibiční aktivity vůči erytrocytární HuAChE a sérové HuBuChE.

Na základě GC/MS analýzy byly identifikovány různé strukturní typy alkaloidů charakterické pro čeleď *Amaryllidaceae*. Podle výše uvedeného dělení byly přítomny všechny typy amarylkovitých alkaloidů, s výjimkou alkaloidů narciklasinového typu. Dominantní postavení měly alkaloidy lykorinového, homolykorinového a tazettinového typu.

Jednotlivé alkaloidní extrakty kultivaru *Narcissus tazetta* se od sebe v nejvyšším procentuálním zastoupení alkaloidů příliš nelišily. Dominantními alkaloidy byly vždy lykorin, homolykorin nebo tazettin. Alkaloidní extrakty se lišily přítomností minoritních alkaloidů galantaminového typu (chlidanthine, 1,2-dihydro-, lykoramin a narwedín), krinového typu (krinin, maritidin), lykorinového typu (galantin), montaninového typu (pankracin) a haemanthaminového typu (haemanthamin). Některé alkaloidy zůstaly neidentifikovány. Důvodem byl nedostatek údajů v literatuře a nedostupnost MS spekter.

V kultivaru *Narcissus jonquilla* byl nejvýše zastoupeným opět lykorin, dominovaly ale alkaloidy galantaminového typu (galantamin, narwedín a lykoramin).

Shrneme-li naměřené inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE, nejvyšší aktivitu měl *Narcissus jonquilla* cv. New baby. Z důvodu rostoucího významu duální inhibice jak HuAChE tak HuBuChE, se proto z pohledu mé práce jeví jako nejvhodnější rostlina právě tato.

7 Literatura

1. Jin, Z.: Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural product reports*, 2009, 26, 363-38
2. Aniszewski, T.: Alkaloids - secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Oxford, Elsevier, 2007, s. 6, ISBN 978-0-444-52736-3
3. Heinrich, M., Teoh, H. L.: Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of ethnopharmacology*, 2004, 92, 147-162
4. Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., Brůčková, L., Cahlíková, L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy*, 2013, 107, 701-708
5. Pidrman, V.: Demence. Vyd. 1. Praha, Grada, 2007, s. 34, ISBN 9788024714905
6. Koukolík, F.: Já: o mozku, vědomí a sebeuvědomování. Vyd. 2., přeprac. Praha, Karolinum, 2013, s. 208, ISBN 9788024623931
7. Jiráček, R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2008, 9, 240-244
8. Thies, W., Bleiler, L.: Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & dementia. *The journal of the Alzheimer's Association*, 2013, 9, 208-245
9. Gauthier, S.: Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Canadian Medical Association Journal*, 2002, 166, 616-623
10. Giacobini, E.: Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2003, 18, 1-5
11. Terry, A. V., Buccafusco, J. J.: The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 306, 821-827
12. Hardy, J., Selkoe, D. J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 297, 353-356
13. Jagtap, V. N., Jagtap, P. N., Maheshwari, K. M., Patil, R. Y.: Biomarkers of Alzheimer disease. *Pharma Science Monitor*, 2014, 5, 39-58
14. Preiss, M., Přikrylová Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii*. Vyd. 1. Praha: Grada., 2006, s. 130, ISBN 8024708434

15. Glenner, G. G., Wong, C. W.: Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 1984, 122, 1131-1135
16. Chaudhari, M. A., Sapkale, P. V., Sahu, M.: A review on Alzheimer's disease (A. D.). *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 2013, 1, 29-42
17. Mudher, A., Lovestone, S.: Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands?. *Trends in neurosciences*, 2002, 25, 22-26
18. Mohandas, E., Rajmohan, V., Raghunath, B.: Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian journal of psychiatry*, 2009 51, 55-61
19. Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K.: Targeting tau protein in Alzheimer's disease. *Drugs & aging*, 2010, 27, 351-365
20. Medina, M., Avila, J.: New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. implications for therapy. *Biochemical pharmacology*, 2014, 88, 540-547
21. Torre, J. C.: Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Annals of the New York Academy of sciences*, 2002, 977, 196-215
22. Su, B., et al.: Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 2008, 5, 525-532
23. Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., & Perry, G.: Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2000, 1502, 139-144
24. Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 2003, 28, 515-522
25. Fukami, T., Yokoi, T.: The emerging role of human esterases. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 2012, 27, 466-477
26. Sridhar, G. R., Sekhar, T., Rao, P. V. N., Rao, A. A.: Human butyrylcholinesterase knock-out equivalent: Potential to assess role in Alzheimer's disease. *Advances in Alzheimer's Disease*, 2012, 1, 1-11
27. Giacobini, E.: Selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Drugs & aging*, 2001, 18, 891-898
28. Pinho, B. R., Ferreres, F., Valentão, P., & Andrade, P. B.: Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, 65, 1681-1700

29. Lam, B., Hollingdrake, E., Kennedy, J. L., Black, S. E., Masellis, M.: Cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease and Lewy body spectrum disorders: the emerging pharmacogenetic story. *Hum Genomics*, 2009, 4, 91-106
30. Jann, M. W., Shirley, K. L., Small, G. W.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clinical pharmacokinetics*, 2002, 41, 719-739
31. Čechová, L., Bartoš, A., Doležil, D., Řípová, D.: Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: Diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, 2011, 12, 175-180
32. Brunovský, M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, 2007, 2, 112-117
33. Imbimbo, B. P.: Pharmacodynamic-tolerability relationships of cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 2001, 15, 375-390
34. Holden, M., Kelly, C.: Use of cholinesterase inhibitors in dementia. *Advances in Psychiatric Treatment*, 2002, 8, 89-96
35. Wagstaff, A. J., McTavish, D.: Tacrine, *Drugs & Aging*, 1994, 4, 510-540
36. Simon, T. et al.: Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 67, 432-437
37. Martorana, A., Esposito, Z., Koch, G.: Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease?. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2010, 16, 235-245
38. Farlow, M. R.: Pharmacokinetic profiles of current therapies for Alzheimer's disease: implications for switching to galantamine. *Clinical therapeutics*, 2001, 23, A13-A24
39. Sozio, P., Cerasa, L. S., Marinelli, L., & Di Stefano, A.: Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2012, 8, 361
40. Tiseo, P. J., Perdomo, C. A., Friedhoff, L. T.: Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *British journal of clinical pharmacology*, 1998, 46, 19-24

41. Williams, B. R., Nazarians, A., Gill, M. A.: A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor. *Clinical therapeutics*, 2003, 25, 1634-1653
42. Adler, G., Mueller, B., & Articus, K.: The transdermal formulation of rivastigmine improves caregiver burden and treatment adherence of patients with Alzheimer's disease under daily practice conditions. *International journal of clinical practice*, 2014, 68, 465-470
43. Spencer, C. M., Noble, S.: Rivastigmine A Review of its use in Alzheimer's Disease. *Drugs & Aging*, 1998, 13, 391-411
44. Wentrup, A., Oertel, W. H., Dodel, R.: Once-daily transdermal rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug design, development and therapy*, 2008, 2, 245-254
45. Zarotsky, V., Sramek, J. J., Cutler, N. R.: Galantamine hydrobromide: An agent for Alzheimer's disease. *American journal of health-system pharmacy*, 2003, 60, 446-452
46. McKeage, K.: Memantine: A review of its use in moderate to severe Alzheimer's disease, *CNS Drugs*, 2009, 23, 881-897
47. Jarvis, B., Figgitt, D. P.: Memantine, *Drugs Aging*, 2003, 20, 465-476
48. Lyseng-Williamson, K. A., McKeage, K. Once-Daily Memantine. *Drugs & aging*, 2013, 30, 51-58
49. Ji, Y., Wu, D., Dai, Q., Guo, L., & Chen, N.: The Research on the Medicinal Value of Amaryllidaceae Plants. *Applied Mechanics and Materials*, 2013, 411, 3223-3226
50. Sambamurty, A. V. S. S.: Taxonomy of angiosperms. New Delhi: I. K. International, 2005, s. 578, ISBN 81-882-3716-7
51. Jahodář, L.: Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 1. Praha, Karolinum, 2006, s. 181, ISBN 8024612259
52. 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, 14, 11713-11741
53. Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J.: Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental

- varieties of *Narcissus* by GC – MS combined with k-means cluster analysis. *Industrial Crops and Products*, 2014, 56, 211-222
54. Wang, Y. H., Wan, Q. L., Gu, C. D., Luo, H. R., Long, C. L.: Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6, 1-6
 55. Cao, Z., Yang, P., Zhou, Q.: Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, 2013, 56, 1382-1391
 56. Giordani, R. B., et al.: Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, 2011, 72, 645-650
 57. López, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, 2002, 71, 2521-2529
 58. převzato z:
<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-genus-galanthus-a-source-of-bioactive-compounds>
 59. Berkov, S., Ivanov, I., Georgiev, V., Codina, C., Pavlov, A.: Galanthamine biosynthesis in plant in vitro systems. *Engineering in Life Sciences*, 2014, 14, 643-650
 60. Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C.: Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2009, 23, 1170-1176
 61. Bastida, J., Lavilla, R., & Viladomat, F.: Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology*, 2006, 63, 87-179
 62. Ji, Y. B., Zheng, J., Chen, N., Song, D. X., Dong, Y., Wang, B. F.: Isocarbostyryl Alkaloids and their Derivatives as Promising Antitumor Agents. *Applied Mechanics and Materials*, 2013, 411, 3150-3153
 63. Ji, Y. B., Song, C. H., Chen, N., Song, D. X., Dong, Y., Zheng, J., Wang, B. F.: Narciclasine-A Potential Anticancer Drug. *Applied Mechanics and Materials*, 2013, 411, 3154-3157

64. Griffin, C., McNulty, J., Pandey, S.: Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 2011, 38, 1549-1556
65. Rigby, J. H., Cavezza, A., Heeg, M. J.: Total synthesis of (\pm)-tazettine. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120, 3664-3670
66. Guan, Y., Zhang, H., Pan, C., Wang, J., Huang, R., Li, Q.: Flexible synthesis of montanine-like alkaloids: revisiting the structure of montabuphine. *Organic & biomolecular chemistry*, 2012, 10, 3812-3814
67. Hong, A. W., Cheng, T. H., Raghukumar, V., Sha, C. K.: An expedient route to Montanine-type Amaryllidaceae alkaloids: Total syntheses of (-)-brunsvigine and (-)-manthine. *The Journal of organic chemistry*, 2008, 73, 7580-7585
68. Cedrón, J. C., et al.: Bioactive montanine derivatives from halide-induced rearrangements of haemanthamine-type alkaloids. Absolute configuration by VCD. *Organic letters*, 2009, 11, 1491-1494
69. Dobson, H. E., Arroyo, J., Bergström, G., & Groth, I.: Interspecific variation in floral fragrances within the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, 25, 685-706
70. Hanks, G. R.: *Narcissus and daffodil: the genus narcissus*. New York, NY, Taylor & Francis, 2002, s. 4-13;39, ISBN 0415273447
71. Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J.: Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Industrial Crops and Products*, 2013, 43, 237-244
72. Bruno, S., De Laurentis, N., Amico, A., Stefanizzi, L.: Chemical investigation and cytologic localization of essential oils in the flowers of *Narcissus tazetta*. *Pharmaceutical Biology*, 1994, 32, 357-361
73. Vazhayil, B. K. et al.: Natural Products and its Derived Drugs for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Alzheimer's Disease-A Review. *British Biomedical Bulletin*, 2014, 2, 359-370
74. Qian, Z. M., Ke, Y.: Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease?. *Frontiers in aging neuroscience*, 2014, 6, 1-4
75. <http://botany.cz/cs/narcissus-tazetta/>

76. Cahlíková, L., et al.: Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*, *Natural product communications*, 2011, 6, 1827-1830
77. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X., Hong, X.: Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC*, 2015, 5, 16562-16574
78. Cahlíková, L. et al.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2011, 21, 575-580
79. Tompsett, A.: *Golden Harvest: The story of Daffodil growing in Cornwall and the Isles of Scily*, Alison Hodge Publishers, 2006, s. 17, ISBN 13978-0-906720-46
80. Doepke, W., Dalmer, H.: Amaryllidaceae alkaloids. *Naturwissenschaften*, 1965, 52, 60-61
81. Gotti, R., Fiori, J., Bartolini, M., Cavrini, V.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2006, 42, 17-24
82. Berkov, S., Martínez-Francés, V., Bastida, J., Codina, C., Ríos, S.: Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*, 2014, 99, 95-106
83. Převzato z:
http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/files/Narcissus/Narcissus_elegans_elegans0_JL.jpg
84. Převzato z:
http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/files/Narcissus/Narcissus_pseudonarcissus_msi.jpg
85. Převzato z:
http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/files/Narcissus/Narcissus_tazetta1NN.jpg
86. Převzato z:
http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/files/Narcissus/Narcissus_jonquilla_msi.jpg

8 Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
Acetyl CoA	acetyl koenzym A
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidní prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervová soustava
DTBN	5,5'- dithiobis – 2 nitrobenzoová kyselina
HupA	huperzin A
ChAT	cholinacetyltransferáza
ChE	cholinesterázy
IChE	inhibitory cholinesterázy
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PHF	spárovaná helikální vlákna
ROS	reaktivní formy kyslíku

Abstrakt

Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* obsahují alkaloidy, které mají rozmanité biologické účinky. Je popsán efekt antivirový, protinádorový, antibakteriální, antimalaritický a antifungální. Významná je také inhibiční aktivita lidských ChE.

Cílem této diplomové práce byla příprava sedmi alkaloidních extraktů jednotlivých kultivarů rodu *Narcissus* a jejich GC/MS analýza, díky které byly identifikovány různé strukturální typy alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*. Nejčastěji identifikované alkaloidy byly homolykorinového, lykorinového, tazettinového a galantaminového typu.

Dále byla změřena biologická aktivita vůči lidské acetylcholinesteráze (HuAChE) a butyrylcholinesteráze (HuBuChE). Nejvyšší inhibiční aktivitu IC_{50} měl alkaloidní extrakt *Narcissus jonquilla* cv. New baby s hodnotami vůči HuAChE $13,78 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ a vůči HuBuChE $96,12 \pm 9,55 \mu\text{g/ml}$. Důvodem byl nejspíše nejvyšší obsah galantaminu ze všech kultivarů, který jak je známo, vykazuje vysoké inhibiční aktivity.

Inhibiční aktivity ostatních kultivarů byly velmi nízké. Bylo u nich identifikováno pouze nízké procentuální zastoupení galantaminu a nebyl přítomen ani žádný jiný alkaloid, který je silným inhibitorem ChE.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, alkaloidy, extrakce, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, screening

Plants from the *Amaryllidaceae* family contain alkaloids that have multiple biological effects. There is described antiviral, antitumor, antibacterial, antimalarial and anti-fungal effect. Activity against human cholinesterases is important too.

The aim of this thesis was to prepare seven alkaloid extracts of individual cultivars of the plants *Narcissus* and then to realize their GC/MS analysis. Thanks to this analysis, several different structural types of alkaloids from the *Amaryllidaceae* family were identified. The most frequently identified alkaloids were homolycorine, lycorine, tazettine and galanthamine type.

This was followed by the measuring of biological activity against human acetylcholinesterase (HuAChE) and butyrylcholinesterase (HuBuChE). The highest inhibitory activity IC_{50} identified the alkaloidal extract of the *Narcissus jonquilla* cv. New baby with the values in relation to HuAChE $13,78 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ and in relation to HuBuChE $96,12 \pm 9,55 \mu\text{g/ml}$. The main reason was probably the highest content of galanthamine of all cultivars, which it is well known that shows high inhibitory activity.

There were other cultivars that showed very low inhibitory activity. There was identified only a low percentage of galanthamine without presence of any other alkaloid, which is a potent inhibitor of ChE.

Keywords: Amaryllidaceae, alkaloids, extraction, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, screening