

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

---

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů  
jednoděložných alkaloidních rostlin. VIII.**

**Neurotropic and antioxidative activity of some selected  
species of monocotyledonous alkaloidal plants *in vitro*. VIII.**

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

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

Hradec Králové, 2015

Kateřina Breiterová

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým samostatně vypracovaným autorským dílem. Veškerá literatura a ostatní zdroje, z nichž jsem při jejím zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou řádně citovány.

V Hradci Králové, 2015

.....

Podpis

Děkuji grantům SVV UK 260 063 a SVV UK 260 184, bez jejichž finanční podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Chtěla bych na tomto místě poděkovat Doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vedení během práce v laboratoři, interpretace MS spekter i vypracování této práce; za cenné rady a poskytnutí studijních materiálů. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. z Katedry farmakognozie za změření biologických aktivit sumárních alkaloidních extraktů a Doc. PharmDr. Radku Kučerovi, Ph.D. z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za změření GC/MS spekter s chemickou ionizací. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a ochotnou pomoc při řešení případných problémů.

# OBSAH

1 ÚVOD .....	6
2 CÍL PRÁCE .....	9
3 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
3.1 Alzheimerova choroba .....	12
3.1.1 Stádia AD.....	12
3.1.2 Diagnostika AD.....	13
3.1.3 Patofyziologie AD.....	14
3.1.4 Terapie AD.....	16
3.2 Čeleď <i>Amaryllidaceae</i> .....	22
3.2.1 Taxonomické řazení a klasifikace .....	22
3.2.2 Biosyntéza <i>Amaryllidaceae</i> alkaloidů.....	23
3.2.3 Rod <i>Galanthus</i> .....	26
3.2.4 Rod <i>Leucojum</i> .....	37
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
4.1 Všeobecné postupy .....	47
4.1.1 Destilace a odpařování .....	47
4.1.2 Materiál a vybavení.....	47
4.2 Příprava sumárních extraktů a GC/MS stanovení .....	47
4.2.1 Biologický materiál.....	47
4.2.2 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu .....	48
4.2.3 GC/MS analýza .....	49
4.3 Měření inhibiční aktivity sumárních extraktů vůči HuAChE a HuBuChE.....	49
4.3.1 Chemikálie a materiál .....	49
4.3.2 Přístroj použitý ke stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity .....	50
4.3.3 Podmínky měření .....	50
4.3.4 Příprava hemolyzátu.....	50

4.3.5 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC <sub>50</sub> ).....	51
4.4 Stanovení antioxidační aktivity.....	52
5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	53
5.1 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Galanthus elwesii</i> ..	54
5.2 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Galanthus woronowii</i> .....	58
5.3 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Leucojum aestivum</i> cv. GRAVETYE GIANT .....	62
5.4 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Leucojum vernum</i> ..	66
5.5 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Narcissus</i> cv. PROFESSOR EINSTEIN .....	69
5.6 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Narcissus</i> cv. QUIRINUS.....	73
5.7 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí <i>Narcissus</i> cv. VIRGINIA SUNRISE.....	77
6 ZÁVĚR .....	81
7 LITERATURA.....	84
8 SEZNAM ZKRATEK.....	95

# 1 ÚVOD

Již od pravěku používali lidé k léčbě a mírnění různých onemocnění rostliny. Z počátku se jednalo spíše o náhodná zjištění či použití metodou pokus – omyl, ale s postupem času se použití celých rostlin či rostlinných drog stávalo více a více sofistikovaným. S rozvojem společnosti, vědy a technických možností lidstva postupně došlo k poznání, že za léčivým, či naopak smrtícím účinkem rostlin stojí konkrétní látka nebo jejich komplex, což vedlo k izolaci látek v čistém stavu, určování jejich biologických aktivit a následně i konkrétních struktur.

Řadu rozmanitých biologických účinků nesou látky vznikající jako sekundární metabolity rostlin. Jednotlivé skupiny sekundárních metabolitů (třísloviny, kardioglykosidy, flavonoidy, ...) se liší nejen účinkem a strukturou, ale většinou je jejich výskyt omezen na jednu čeleď, popřípadě na skupinu příbuzných čeledí rostlin. Mezi tyto látky se řadí i alkaloidy. Jedná se o heterogenní skupinu organických látek obsahujících ve své molekule atom dusíku. Jednotlivé skupiny alkaloidů se liší svou strukturou a biosyntetickou cestou vzniku. Alkaloidy se zdaleka nevyskytují ve všech čeledích a výskyt jejich určitého spektra bývá pro jednotlivé čeledi charakteristický. Bylo zjištěno, že alkaloidy biosynteticky vycházejí z aminokyselin (AMK) – hlavně aromatických (fenylalanin, tyrosin, histidin, tryptofan), ale i alifatických (ornitin, lysin). Na syntéze alkaloidů se mohou podílet i další AMK, jako je glycin, cystein, prolin, methionin a kyselina asparagová. Enzymatické a chemické přeměny, jimiž jednotlivé AMK během biosyntézy alkaloidů projdou, jsou velmi rozličné a podle toho se liší i výsledné molekulové skelety jednotlivých typů alkaloidů. Ty mohou být terpenoidní povahy, steroidní, cyklické, aromatické i alifatické<sup>1</sup>.

Jednou z významných čeledí obsahujících alkaloidy je právě čeleď *Amaryllidaceae*. Rostliny této čeledi jsou vytrvalé byliny náležící k přibližně 85 rodům, jež zahrnují více než 1100 druhů<sup>2</sup>. Skupina látek, které se v ní vyskytují (tzv. *Amaryllidaceae* alkaloidy, AmA), je pro ni zcela charakteristická. Do dnešní doby bylo strukturně popsáno na 500 těchto látek<sup>2</sup> a spektrum jejich biologických účinků je velmi široké – zahrnuje aktivitu protizánětlivou, protivirovou<sup>3</sup>, antineoplastickou, antiparazitickou, antimykotickou<sup>4</sup>, antibakteriální, analgetickou a v neposlední řadě inhibují erytrocytární AChE a sérovou BuChE<sup>5</sup>.

Poslední zmíněné aktivity se již od padesátých let využívá v terapii Alzheimerovy choroby (Alzheimer's disease, AD). Z AmA je k zpomalení progresu tohoto onemocnění používán galanthamin, který je selektivním reverzibilním inhibitorem

AChE. Vzhledem k nárůstu koncentrace BuChE u pacientů postižených AD, je perspektivní výzkum zaměřený na hledání duálních inhibitorů obou těchto enzymů<sup>6</sup>. Látky inhibující AChE jsou známy již delší dobu, ale výzkum přírodních látek s inhibiční aktivitou vůči BuChE je zatím relativně na začátku. Některé ze sumárních extraktů získaných z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* vykazaly zajímavou inhibiční aktivitu vůči BuChE, proto by mělo být předmětem dalšího výzkumu izolovat jednotlivé AmA ze sumárních extraktů a testovat je v čisté formě, abychom zjistili, které z alkaloidů jsou za tuto aktivitu zodpovědné.



## **2 CÍL PRÁCE**

Cíle diplomové práce:

1. Zpracování rešerše k problematice alkaloidních rostlin ze zadaných taxonomických jednotek čeledi Amaryllidaceae (výskyt, struktura, biologická aktivita, využití apod.).
2. Příprava alkaloidních extraktů rostlin
3. GC/MS analýza alkaloidních extraktů. Identifikace obsahových látek.
4. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči erytrocytární acetylcholinesterase a sérové butyrylcholinesterase.
5. Vyhodnocení výsledků a sepsání práce.

## **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### **3. 1 Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění klinicky se projevující syndromem demence a končící letálně<sup>7</sup>. AD je nejčastější příčinou demence u lidí vyššího věku. Přestože může být demence zapříčiněna řadou jiných onemocnění, ve více než 50 % případů je způsobena právě Alzheimerovou chorobou<sup>8</sup>. Dalšími příčinami mohou být na příklad vaskulární demence (s incidencí 10 – 20 %), s Lewyho tělísky (1-25 % dle typu studie) či vzácná frontotemporální demence (1 %)<sup>9</sup>.

Etiopatogeneze AD není bohužel zatím zcela známa, což vede k tomu, že ji zatím neumíme léčit kauzálně, ale pouze symptomatologicky. Přesto je symptomatická léčba AD velmi důležitá a je nezbytné ji nasadit co nejdříve, neboť vede k oddálení nástupu nemoci nebo alespoň k prodloužení mírné fáze onemocnění oproti pozdějším závažnějším stádiím. Aby byla nasazena včas odpovídající léčba, je potřeba také správná a rychlá diagnostika onemocnění<sup>7</sup>.

#### **3.1.1 Stádia AD**

Průběh Alzheimerovy choroby může být rozdělen do sedmi stádií od bezpříznakového období až po velmi závažný kognitivní rozvrat a následnou smrt<sup>10</sup>. Nejčastěji jsou v průběhu onemocnění rozlišována tři stádia:

##### **3.1.1.1 Mírná forma AD**

Skutečný začátek AD je velmi těžké rozpoznat – příznaky jsou často připisovány běžným projevům stárnutí, než se objeví potíže, které začnou být nápadné okolí nemocného člověka. Prvním příznakem jsou poruchy krátkodobé paměti, kdy si pacient není schopný vybavit objektivně nedávné události. Mezi další příznaky 1. stádia onemocnění patří přechodně zhoršená orientace pacienta v čase a posléze i v prostoru. Pacientovi činí čím dál větší obtíže o něčem rozhodnout, něco naplánovat či dokonce zorganizovat (jsou porušeny tzv. exekutivní funkce) a ztrácí zájem o své záliby a zaměstnání. Také se může projevit afázie, kdy nemocný s AD obtížně vyjadřuje své myšlenky pomocí slov.

V tomto stádiu si pacient svou nemoc uvědomuje, což může vést mimo jiné k rozvoji deprese, protože pacient si je vědom svého selhávání, ale nemůže mu zabránit.

### **3.1.1.2 Středně závažná forma AD**

V této fázi onemocnění dochází k výraznému zhoršení paměti – pacient si již nepamatuje, kde bydlí, jakou školu vystudoval, nebo dokonce jak se jmenují jeho příbuzní. Prostorová orientace je natolik zasažena, že se pacient ztratí i na dříve mu velmi dobře známých místech. Je narušeno i vnímání aktuální situace – jsou porušeny základní hygienické návyky, pacient potřebuje na příklad pomoci s výběrem správného oblečení ve vztahu k ročnímu období, denní době, apod. Zároveň dochází k významnému rozvinutí nekognitivních poruch souhrnně označovaných jako BPSD (behaviorální a psychologické symptomy u demencí). Mezi tyto poruchy patří kupříkladu toulání se po bytě i mimo něj, apatie či naopak agitace, poruchy vnímání a myšlení jako halucinace a bludy, bezdůvodná fyzická nebo verbální agresivita vůči sobě i okolí. Může se objevit již dříve zmíněná deprese a anxieta stejně jako mánie.

### **3.1.1.3 Závažná forma AD**

V tomto stádiu nemoci je pacient zcela závislý na svém okolí – není sám schopný se najíst, umýt a obléct. V tomto období není neobvyklé, že je pacient inkontinentní. Dochází k úplnému rozvratu osobnosti pacienta, který již nebývá schopný opustit byt a posléze je upoután na lůžko, neboť ztrácí kontrolu nad svým pohybem, a je zcela odkázán na pomoc ostatních. Nastává prohloubení poruch chování zmíněných výše. Toto stádium končí letálně<sup>6,8-10</sup>.

## **3.1.2 Diagnostika AD**

Stanovit diagnózu Alzheimerovy choroby není snadné a je potřeba vyloučit ostatní možné příčiny demence (tumor či zánětlivé léze v mozku, mozkovou ischémii, roztroušenou sklerózu, intrakraniální hematomy, perniciózní anémii, neurosyfilis, Lymeskou boreliózu, intoxikaci alkoholem či těžkými kovy, ...)<sup>9</sup>.

Existují různá diagnostická kritéria a postupy, pomocí nichž lze AD diferenciatně stanovit. V roce 1984 byla formulována kritéria NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders – Alzheimer's Disease and Related Dementias Association), která sledují řeč, paměť, pozornost, vnímání, orientaci, schopnost řešení problémů a normálního fungování pacienta a jeho konstrukční dovednosti. Podle těchto jednotlivých kognitivních aspektů chování, na něž je pacient

testován klinicky i psychologicky, dojde ke stanovení pravděpodobnosti diagnózy Alzheimerovy choroby na škále pravděpodobná – možná – nepravděpodobná – jistá<sup>7</sup>.

Další možností je diagnostika pomocí sledování strukturních změn v mozku - na příklad změna objemu hipokampů a temporálních rohů postranních mozkových komor pomocí magnetické rezonance (MRI)<sup>8</sup> nebo metabolických změn pomocí pozitronové emisní tomografie (PET)<sup>7</sup>, která je ale zatím málo využívaná.

Z pomocných testů jsou využívány mimo jiné Mini-Mental State Examination (MMSE), jež se zaměřuje na testování kognitivních funkcí pacienta. Zdravý pacient by v tomto testu měl získat plných 30 bodů – výsledek  $\leq 25$  bodů může značit počínající demenci. Je ale potřeba vzít ohled na momentální stav testovaného pacienta, který by mohl zkreslit výsledky testu (hospitalizace, šoková situace,...). Tento test je spíše orientačního charakteru. Dalšími z používaných testů je tzv. Test hodin (Clock Drawing Test, CDT) nebo test aktivit běžného denního života (Disability Assessment for Dementia, DAD). Komplexnější je potom škála Alzheimer's Disease Assessment Scale (ASAD), která zahrnuje a zkoumá kognitivní i nekognitivní část onemocnění<sup>9</sup>.

### **3.1.3 Patofyziologie AD**

Jak již bylo zmíněno, všechny příčiny a rizikové faktory vzniku a rozvoje Alzheimerovy choroby nejsou v dnešní době zatím známy. Hlavní patofyziologické projevy jsou shrnuty pod tzv. amyloidní teorii a poruchy cholinergního a glutamátového systému, které vedou ke zhoršení neurotransmise v mozku. Ani jeden z těchto faktorů samostatně nemůže za všechny projevy AD, proto musí jít o jejich kombinaci.

#### **3.1.3.1 Amyloidní teorie**

Tato teorie je založena na ukládání amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) v mozku za vzniku extracelulárních amyloidních plaků – někdy též zvaných jako plaky Alzheimerovské či senilní.  $A\beta$  fyziologicky vzniká z amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Jedná se o transmembránový protein produkovaný neurony, jehož funkce ještě nebyla zcela objasněna, ale má se za to, že podporuje růst a životaschopnost neuronů a motilitu a prodlužování neuritů<sup>11</sup>. Proteolytickým působením  $\alpha$ -sekretasy vznikají z APP oligopeptidy čítající 40 AMK –  $A\beta_{1-40}$ . Tyto fragmenty jsou rozpustné, netvoří depozita a pravděpodobně mají fyziologickou funkci, která nebyla zatím zcela objasněna – pravděpodobně se podílejí na tvorbě neuronů již před narozením<sup>12</sup>. V případě vyskytnuvší se patologie dochází ke zvýšenému štěpení  $A\beta$  působením  $\beta$ - a  $\gamma$ -

sekretas, které odštěpují z APP fragmenty dlouhé 42 AMK – A $\beta$ 1-42<sup>13</sup>, které jsou hydrofóbnější než fyziologické A $\beta$ 1-40 oligopeptidy, a tudíž jsou hůře rozpustné a hromadí se v mozku nemocného člověka ve formě plaků<sup>14</sup>. V okolí ložisek A $\beta$  dochází k aktivaci gliových buněk, což vede ke spuštění produkce cytokinů, cyklooxygenasy 2 (COX-2), volných kyslíkových radikálů a zvýšené syntéze prostaglandinů, což v kombinaci vede ke spuštění zánětlivé reakce, poškození nervových vláken a posléze apoptóze neuronů<sup>8</sup>.

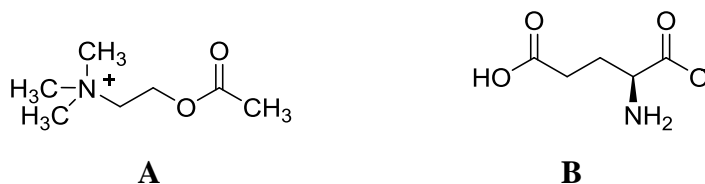
Toxicita A $\beta$  se neprojevuje pouze zánětlivou reakcí a oxidativním poškozením neuronů, ale i tvorbou intracelulárních neurofibrilárních uzlíků (tangles), které vznikají hyperfosforylací tau ( $\tau$ ) proteinu. T protein je spjat s mikrotubuly axonů a jeho fosforylace je fyziologicky kontrolována rozpustnou formou A $\beta$ . Hyperfosforylace  $\tau$  proteinu vede k polymeraci nervových vláken za vzniku neurofibrilárních uzlíků, což u zasažených neuronů následně vede k apoptóze. Na vzniku uzlíků se pravděpodobně podílí i patologický A $\beta$ 1-42, ale mechanismus jeho působení není ještě zcela znám<sup>11,14</sup>.

### **3.1.3.2 Cholinergní teorie**

Samotný vznik amyloidních plaků v mozku nedokáže vysvětlit rozvoj kognitivních poruch u pacientů s AD. Tyto poruchy jsou způsobeny porušením metabolismu a funkce acetylcholinu<sup>15</sup> (ACh, **Obr. 1A**), který přenáší nervový impuls na synapsi. Při AD je patologicky změněna syntéza ACh, neboť je tvořeno méně cholinacetyltransferasy v buňkách mozkové kůry a je zhoršen i uptake cholinu, který se spolu s acetylkoenzymem A (acetyl-CoA) podílí na tvorbě molekuly ACh<sup>6</sup>. Je také zvýšeno štěpení ACh v synaptické štěrbině působením cholinesteras<sup>16</sup>.

Hlavním fyziologicky působícím enzymem odbourávajícím ACh na synapsi je acetylcholinesterasa (AChE), která se v mozku vyskytuje ve dvou formách – monomerní G1 a tetramerní G4. V mozku zdravého člověka výrazně převažuje forma G4, ale u pacienta trpícího AD se začínají množství obou forem vyrovnávat, až převáží G1 forma AChE). U pacientů s AD se navíc začíná v mozku zvyšovat koncentrace butyrylcholinesterasy (BuChE), jež se také účastní štěpení ACh. U zdravých jedinců je však její podíl na tomto ději zcela minoritní. Všechny tyto jevy ( $\downarrow$  syntéza ACh a uptake cholinu,  $\uparrow$  rozklad ACh cholinesterasami) a skutečnost, že dochází k redukci počtu nikotinových receptorů pro ACh (množství muskarinových receptorů se prakticky nemění), vedou k celkovému zhoršení neurotransmise zprostředkované ACh. Toto

zhoršení jde zpomalit pomocí inhibitorů cholinesteras – zatím hlavně AChE, o nichž bude řeč níže<sup>16</sup>.



**Obr. 1** Struktura acetylcholinu (A) a glutamátu (B)

### 3.1.3.3 *Glutamátergní systém*

Jedná se o systém excitačních AMK v mozku, z nichž glutamát (**Obr. 1B**) je nejrozšířenější. Role tohoto systému neuromediátorů je velmi důležitá pro proces učení a vytváření paměťových stop, který je spojen s vazbou glutamátu na ionotropní *N*-methyl-*D*-aspartátové receptory (NMDA receptory), (*S*)-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové (AMPA receptory) a kainátové receptory. Stimulace NMDA receptorů glutamátem je spojena s influxem vápenatých  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do neuronů a následnou tzv. dlouhodobou potenciací. Glutamátergní neurony se vyskytují hlavně v kůře mozku, amygdalách, bazálních gangliích a hipokampu. Právě korové oblasti a hipokampus bývají při AD významně zasaženy takže v pozdějších stádiích onemocnění dochází k postižení funkce excitačních AMK a jejich přílišné produkci. Tato skutečnost vede ke vzniku velkého množství šumů, což zhoršuje přenos správných signálů mezi neurony<sup>6</sup>. Navíc je působením jednoho z fragmentů  $\text{A}\beta$  zhoršen i reuptake glutamátu, což v důsledku zvýšené koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v neuronu vede k excitotoxicitě (tvorba volných radikálů, poškození mitochondrií, poškození chromatinu) a apoptóze buňky<sup>17,18</sup>.

### 3.1.4 Terapie AD

Vzhledem k tomu, že přesná etiopatofyziologie AD není ještě zcela známa, není terapie tohoto onemocnění kauzální, ale pouze symptomatická. Tato terapie AD nevyлéčí ani nezastaví, ale alespoň zpomalí progresi onemocnění a prodlouží mírnější stádia nemoci oproti stádiím těžším.

V současné době se používají dvě skupiny látek – inhibitory cholinesteras (donepezil, rivastigmin, galanthamin) a inhibitory NMDA receptorů (memantin). Tyto látky se kombinují také s nefarmakologickou léčbou jako je trénink paměti, aktivizace pacienta, rehabilitace, znovuučení aktivit běžného života<sup>9</sup>.



### 3.1.4.1 *Inhibitory cholinesteras*

Léčiva patřící do této farmakologické skupiny se také označují jako kognitiva – tj. léčiva zpomalující prohlubování kognitivního deficitu (zhoršování paměti, orientace, schopnosti plánovat, ...). Tyto látky inhibují HuAChE a HuBuChE, které štěpí ACh v synaptické štěrbině, čímž dochází ke zvýšení koncentrace ACh na synapsi a zlepšení nervového přenosu. Navíc při podávání těchto látek dochází i ke snížení tvorby a následné toxicity A $\beta$  v mozku pacienta s AD, což se také podílí na zpomalení postupu onemocnění<sup>9</sup>. Inhibitory cholinesteras se samotné používají v mírné a středně těžké fázi onemocnění<sup>6</sup>, v těžších stádiích nemoci se kombinují s memantinem. Terapie těmito inhibitory je volena na základě MMSE testu<sup>9</sup> – pojišťovny ji v ČR hradí pacientům s výsledkem 25 – 13 bodů z 30 možných a tento test je opakován každé 3 měsíce od započetí léčby inhibitory cholinesteras. Po prvních 3 měsících se v terapii pokračuje, pokud se pacientovo skóre v MMSE testu nezhoršilo více než o dva body. K ukončení terapie dochází u pacientů, u nichž se po 6, 9, 12, ... měsících nepodařilo zpomalit progresi onemocnění (pokles o více než 2 body v MMSE) nebo v tomto testu získali  $\leq$  12 bodů<sup>19</sup>.

#### Donepezil (Adonep®, Altzer®, Alzil®, Apo-Donepezil®, Aricept®, ...)

Tento derivát piperidinu reverzibilně a nekompetitivně inhibuje obě formy HuAChE (G1 i G4), ale HuBuChE nikoliv. Toto léčivo (**Obr. 2A**) je pacienty dobře snášeno a nepůsobí žádné nežádoucí účinky závažného charakteru. Kromě AD je používán i k terapii u pacientů s demencemi s Lewyho tělísky<sup>19,20</sup>.

#### Rivastigmin (Exelon®, Nimvastid®, Prometax®, Rivastigmin ACTAVIS®, ...)

Karbamátový derivát rivastigmin (**Obr. 2B**) je centrálním inhibítorem lidských cholinesteras – dualisticky inhibuje aktivitu HuAChE (G1 i G4) i HuBuChE<sup>9</sup>, jejíž koncentrace je právě u pacientů s AD zvýšena. Rivastigmin se také používá ke zpomalení progresu demencí s Lewyho tělísky<sup>21</sup>.

#### Galanthamin (Galantamin JENSON®, Galantamin MYLAN®, Galsya SR®, ...)

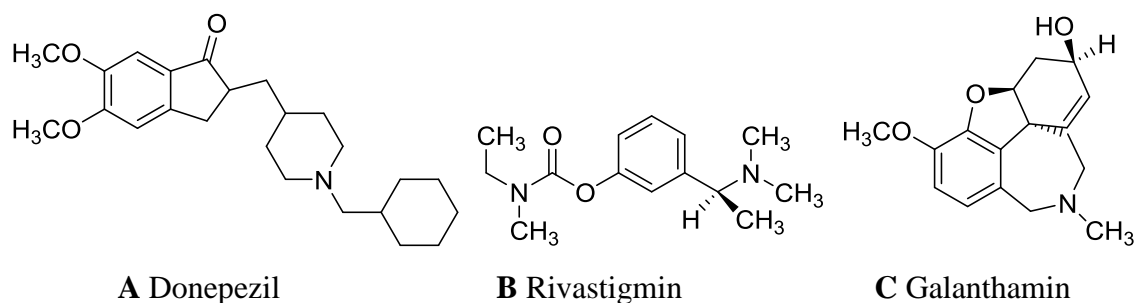
Toto léčivo patří do skupiny tzv. *Amaryllidaceae* alkaloidů, což jsou látky s celou řadou biologických účinků vyskytující se hlavně v různých rodech čeledi *Amaryllidaceae*

(amarylkovité). Galanthamin (**Obr. 2C**) je jedním z alkaloidů silně zastoupených v této čeledi – vyskytuje se mimo jiné v rodech *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus*<sup>5,23</sup>.

Dříve byl galanthamin využíván k terapii svalové paralýzy vyvolané tubokurarinem a v zemích Východního bloku se používal po anestezii, při níž byla podána nedepolarizující myorelaxancia (pankuronium, vekuronium, mivakurium). V současné době se používá krátkodobý inhibitor HuAChE neostigmin, který je v této indikaci přibližně 20x účinnější. Dalším z účinků galanthaminu je jeho schopnost antagonizovat analgetika morfinového typu – hlavně jimi navozenou depresi dýchacího centra, ale zároveň podpořit jejich analgetický účinek vazbou na opioidní receptor<sup>5</sup>.

Hlavním účinkem, pro který je v dnešní době galanthamin používán, je jeho dlouho působící, reverzibilní, kompetitivní, výrazně selektivní inhibice HuAChE<sup>6,9,22,23</sup> - jeho inhibiční aktivita vůči HuBuChE je mnohem nižší ( $IC_{50, HuAChE} = 1,71 \pm 0,06 \mu M$ ,  $IC_{50, HuBuChE} = 42,3 \pm 1,3 \mu M$ )<sup>24</sup>. Galanthamin je zároveň allosterickým modulátorem presynaptických i postsynaptických nikotinových receptorů pro ACh<sup>6</sup> – v jeho přítomnosti se zvyšuje afinita ACh k těmto receptorům, což vede k zlepšení cholinergní transmise.

Galanthamin bývá pacienti relativně dobře snášen a většina jeho nežádoucích účinků souvisí právě s jeho periferními cholinergními projevy, jako jsou nevolnost, zvracení, závratě, průjemy, bolesti hlavy, poruchy spánku, případně neklid<sup>25</sup>. Užívání galanthaminu se může projevit i kolísáním krevního tlaku, ale během ročního sledování skupiny pacientů nebyly žádné výraznější změny v krevním tlaku zaznamenány<sup>26</sup>. Kromě AD je galanthamin používán v terapii poliomyelitis a dalších neurologických onemocnění<sup>5,23</sup>.



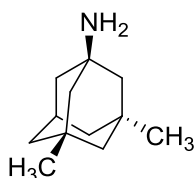
**Obr. 2** Používané inhibitory cholinesteras

### 3.1.4.2 Antagonisté NMDA receptorů

Z těchto látek se v současné době v praxi používá pouze memantin, který je indikován při výsledku MMSE v rozmezí 19 – 6 bodů, což znamená, že je používán v středně těžkých až těžkých stádiích AD<sup>27</sup>. Lze ho použít i k terapii vaskulární demence.

Memantin (Axura®, Cognomem®, Ebixa®, Mantomed®)

Tento aminoderivát adamantanu (**Obr. 3**) je nekompetitivním parciálním antagonistou NMDA receptorů, který působí tím, že blokuje iontový kanál spřažený s NMDA receptorem<sup>6</sup>. Takto brání funkčním projevům receptorů aktivovaných nadměrným množstvím glutamátu a napomáhá tak správnému šíření nervových vzruchů bez šumů a blokádou influxu Ca<sup>2+</sup> brání projevům excitotoxicity a indukcii apoptózy neuronu<sup>17</sup>.



**Obr. 3** Struktura memantinu

### 3.1.4.3 Perspektivní terapie Alzheimerovy choroby v budoucnosti

Vzhledem k různorodosti příčin a rizikových faktorů AD je potřeba zaměřit její terapii na co nejširší spektrum z nich, abychom mohli v budoucnosti rozvoj AD zastavit nebo zpomalit více, než je to možné v současnosti. V následujících odstavcích je uvedeno několik nových možností, které jsou v různých fázích preklinického či už klinického testování.

#### Huperzin A

Huperzin A (**Obr. 4A**) je pyrolyzidinový alkaloid izolovaný z vrance pilovitového (*Huperzia serrata*, *Huperziaceae*)<sup>28</sup>. Tento alkaloid je možné najít i v čeledi *Lycopodiaceae* a rodu *Selaginella* (huperzin je někdy označován jako selagin)<sup>29</sup>.

Po rychlém přestupu přes hematoencefalickou bariéru (HEB) působí tato látka jako reverzibilní selektivní inhibitor tetramerní G4 formy HuAChE (ostatní látky inhibují i G1 formu), což vede zmírnění projevů a zpomalení progresu AD<sup>29</sup>. Díky rychlejšímu

přestupu přes HEB má Huperzin A méně periferních nežádoucích účinků než galanthamin<sup>28</sup> a navíc díky svým antioxidačním vlastnostem mírní i neurotoxické působení A $\beta$ , který mimo jiné indukuje uvolňování volných kyslíkových radikálů v mozku. Mimo již zmíněné účinky působí huperzin A i jako antagonist NMDA receptorů, což vede ke snížení excitotoxicity způsobené nadměrným působením glutamátu<sup>29</sup>.

Tento alkaloid je prozatím v klinickém testování – v Číně, kde se *Huperzia serrata* používá jako součást tradiční medicíny, je již ve čtvrté fázi – tzn. je již v klinickém používání, a v USA vstoupil do fáze třetí<sup>28,29</sup>.

### Rutaekarpin

Tento chinazolinokarbolinový alkaloid (**Obr. 4B**) se izoluje z plodů stromu *Evodia rutaecarpa* (*Rutaceae*), které jsou déle než 2000 let využívány v rámci tradiční čínské medicíny. Rutaekarpin je mj. silným selektivním inhibitorem HuAChE a má i protizánětlivý účinek<sup>28,30</sup>. Vzhledem k velkému množství nežádoucích účinků se rutaekarpin v praxi nepoužívá, ale slouží jako předlohová struktura pro přípravu semisyntetických derivátů<sup>28</sup>.

### Protilátky proti amyloidu $\beta$

Vzhledem k nepopíratelnému podílu neurotoxicity A $\beta$  byla pouze otázka času, kdy se výzkum zabývající se hledáním způsobů terapie AD stočí tímto směrem. V klinickém testování je nyní několik vakcín pro pasivní i aktivní imunizaci proti A $\beta$ <sup>13</sup>.

Principem pasivní imunizace je umělé udržení hladin protilátek proti A $\beta$ <sup>13</sup>. V třetí fázi klinického testování je na příklad monoklonální protilátka gantenerumab. U jiných byly klinické studie ve třetí fázi zastaveny pro nedostatek důkazů o účinnosti (solanezumab, bapineuzumab)<sup>14</sup>. Nevýhodou monoklonálních protilátek je, že nežádoucí účinky mohou být zpožděné, takže mohou být odhaleny až několik let po případném uvedení těchto látek do klinické praxe. Další možností pasivní imunizace jsou tzv. intravenózní imunoglobuliny (IVIG) – směs přirozených imunoglobulinů, které po intravenózním podání začnou tvořit protilátky proti A $\beta$  ale i jiným patologickým proteinům, neboť IVIG nedetekují molekulu A $\beta$ , ale skutečnost, že není fyziologická<sup>16</sup>.

Pro aktivní imunizaci proti A $\beta$  byla vyvinuta látka označovaná jako AN1792<sup>11,14</sup>, jejíž účinek se projevil postupným odstraňováním amyloidových plaků. Tato látka ale

musela být stažena v druhé fázi klinického testování v důsledku výskytu aseptické meningoencefalitidy u 6 % testovaných jedinců<sup>14</sup>.

#### Modulátory sekretas

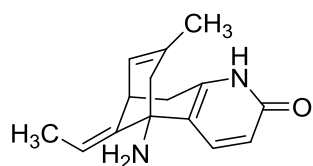
Do patologie A $\beta$  zasahují ještě modulátory jednotlivých sekretas – stimulátor  $\alpha$ -sekretasy (cerebrosterol – v klinických studiích). Na stimulaci  $\alpha$ -sekretasy se testují statiny – z APP se špatné A $\beta$  fragmenty snáz odštěpují, je-li vyšší hladina cholesterolu, ale jejich účinek je sporný. Cerebrosterol působí též jako blokátor  $\beta$ -sekretasy, čímž brání vzniku dalších molekul A $\beta$ .  $\Gamma$ -sekretasu lze blokovat pomocí semagacestatu, který brání vzniku prekursoru A $\beta$ . Tato látka má klinicky prokázanou účinnost, ale také celou řadu závažných nežádoucích účinků, jako je zvýšené riziko rakoviny kůže, imunologické a hematologické poruchy, takže byla pozastavena třetí fáze klinického testování. Podobným účinkem, jako má semagacestat, působí modulátor  $\gamma$ -sekretasy tarenflurbil, ovšem bez výše zmíněných závažných nežádoucích účinků. Tato látka se zatím jeví slibně a je ve třetí fázi klinického testování<sup>14,16</sup>.

#### Ostatní

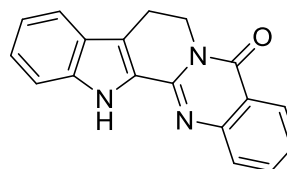
Klinické testy s různými výsledky probíhají pro celou řadu dalších látek, jako jsou na příklad kurkumin (**Obr. 4C**) z *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*) (antioxidační působení), tokoferoly (antioxidanty – vychytávají volné radikály), dimebon (úprava neuronálního metabolismu), extrakt z *Ginkgo biloba* (*Ginkgoaceae*) (podpora inhibitorů HuAChE v počátečních stádiích AD) a lithium (zabraňuje degradaci  $\tau$  proteinu blokádou GSK<sub>3</sub>B receptoru)<sup>16</sup>.

Další variantou, která je zatím pouze předmětem výzkumu, jsou inhibitory prolyloligopeptidasy (POP) jako adjuvantní terapie demencí a dalších psychických onemocnění jako je schizofrenie či bipolární afektivní porucha. POP je cytozolová serinová proteasa, která štěpí menší peptidy v místě aminokyseliny prolinu – jedná se na příklad o substanci P, vazopresin a některé neuropeptidy, které slouží jako modulátory kognitivních funkcí, takže inhibice POP vede ke zvýšení jejich koncentrace a tím ke zlepšení (resp. k pomalejší progresi) kognitivních funkcí<sup>31</sup>. Jedním z inhibitorů POP je fenolický derivát bajkalin (**Obr. 4D**) izolovaný z kořene *Scutellaria baicalensis* (*Lamiaceae*, šišák bajkalský)<sup>32</sup>. Inhibiční aktivita bajkalinu slouží jako standard pro

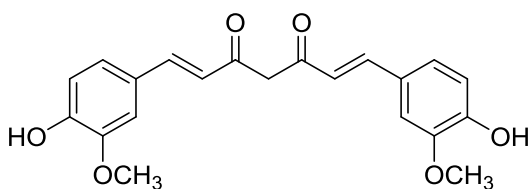
testování inhibiční aktivity ostatních látek –  $IC_{50} = 0,610 \pm 0,021$  mM. Jako POP inhibitor až čtyřikrát silnější než bajkalin se v laboratorních podmínkách jeví 9-*O*-demethylgalanthin s  $IC_{50} = 0,146 \pm 0,016$  mM<sup>31</sup>. Mezi látky s POP inhibiční aktivitou patří i deriváty propylizoxazolu<sup>33</sup>.



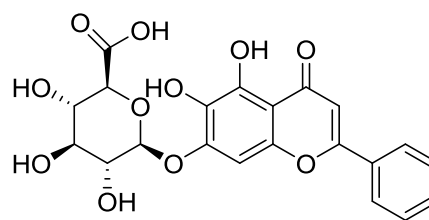
**A** Huperzin A



**B** Rutaekarpin



**C** Kurkumin



**D** Bajkalin

**Obr. 4** Látky perspektivní v terapii AD

## 3.2 Čeleď *Amaryllidaceae*

### 3.2.1 Taxonomické řazení a klasifikace<sup>34</sup>

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheophyta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)

Řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

Čeleď: amarylkovité (*Amaryllidaceae*)

Rostliny této čeledi náleží k více než 1100 druhům rozdělených do 85 rodů<sup>2</sup>, z nichž můžeme zmínit na příklad rody *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Amaryllis*, *Clivia*, *Hippeastrum*, *Haemanthus*, *Lycoris*, *Sternbergia* a *Zephyranthes*<sup>23,35</sup>. Na území České republiky se můžeme setkat s volně rostoucími rostlinami prvních tří zmíněných rodů, ostatní rody jsou domácí hlavně v jižní Evropě a jižněji položených částech Evropy střední<sup>36</sup>.

Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* jsou vytrvalé byliny s čárkovitými listy, které bývají přizemní a přisedlé a často je jeden z listů modifikovaný na blanitou pochvu objímající baze ostatních listů, ale mohou být i lodyžní. Rostliny mají nejčastěji podzemní cibule, ale mohou se objevit i hlízy či oddenky. Květy jsou oboupohlavné jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích<sup>2,32</sup>.

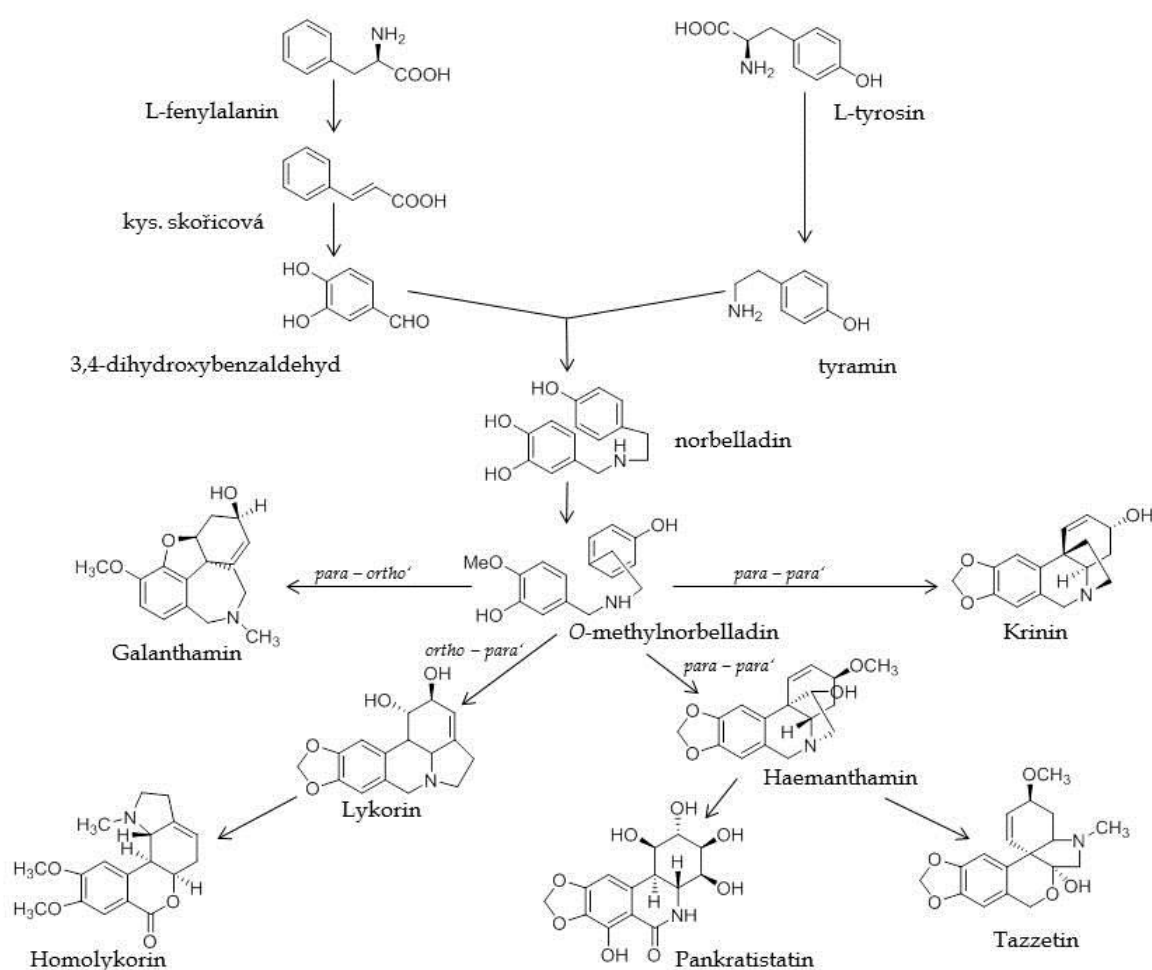
Pro tuto čeleď je charakteristický obsah isochinolinových alkaloidů zvaných jako *Amaryllidaceae* alkaloidy, jež z ní činí jednu z dvaceti nejdůležitějších čeledí obsahujících alkaloidy. Produkují alkaloidy, kterých bylo do dnešní doby strukturně popsáno na 500<sup>2</sup> a jsou velmi různorodé, co se účinků týká – nalezneme látky s působením proti cholinesterasám, účinky antimykotickými, cytotoxickými<sup>4</sup>, antivirotickými<sup>3</sup>, antiparazitickými, analgetickými a jinými dalšími<sup>5,37,38</sup>, pro něž byla řada těchto rostlin používána již v tradiční medicíně.

### 3.2.2. Biosyntéza *Amaryllidaceae* alkaloidů

Látky isochinolinového typu patřící do skupiny AmA je možné izolovat z rostlin všech rodů čeledi *Amaryllidaceae*. Jak již bylo zmíněno, v současné době známe více než 500 těchto látek. Podle různých zdrojů je rozlišováno sedm až devět základních skupin těchto látek, které se liší svým skeletem a z nichž se odvozují další strukturní podskupiny. Tyto základní strukturní typy jsou: lykorinový, homolykorinový, galanthaminový, krininový, haemanthaminový, pankratistatinový a tazettinový<sup>2,4</sup>.

Jak můžete vidět na obrázku (**Obr. 5**) biosyntetická cesta vedoucí k AmA začíná oxidativním fenolovým spojením aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu<sup>39</sup>. L-fenylalanin je enzymaticky přeměněn na kyselinu skořicovou a dále na 3,4-dihydroxybenzaldehyd, který reaguje s tyraminem, jež vznikl z L-tyrosinu působením tyrosindekarboxylasy<sup>40</sup>. Tyto meziprodukty spolu kondenzují za vzniku intermediátu typu Schiffovy baze, z něhož přes norbelladin postupně vznikne 4'-*O*-methylnorbelladin a z něj oxidativním spojením, na němž se mimo jiné podílejí i

enzymy cytochromu P450, vznikají AmA. Podle typu této oxidativní cyklizace molekuly 4'-*O*-methylnorbelladinu vznikají rozdílné strukturní typy, jejichž struktury a zástupci jsou zobrazeny v následující tabulce (**Tab. 1**) – spojením *para* – *ortho*' vznikají alkaloidy galanthaminového typu, spojením *para* – *para*' alkaloidy haemanthaminového, krininového, pankratistatinového a tazettinového typu a spojením *ortho* – *para*' vznikají alkaloidy typu lykorinového a homolykorinového<sup>4,38</sup>. Z těchto struktur posléze řadou chemických reakcí, jako je na příklad oxidace, redukce, hydroxylace, methylace či naopak demethylace vznikají další strukturní typy AmA<sup>2</sup>

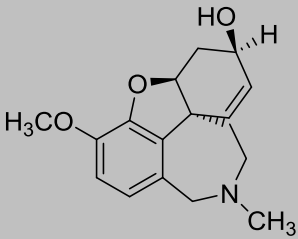
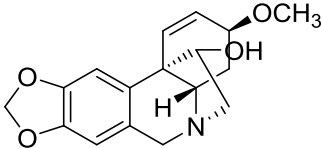
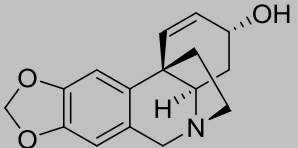
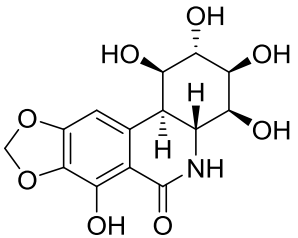
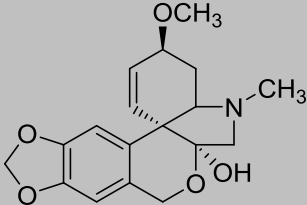
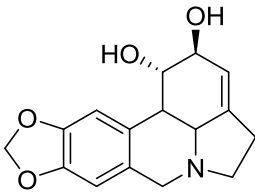


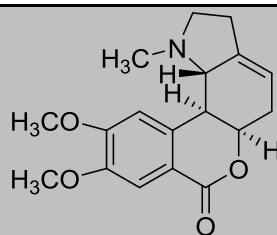
**Obr. 5** Norbelladinová cesta biosyntézy AmA<sup>4</sup>

V jednotlivých druzích této čeledi se mohou objevovat různorodé směsi alkaloidů jednotlivých strukturních typů, jindy v rostlině převažují alkaloidy pouze jednoho strukturního typu<sup>38</sup>.



**Tabulka 1** Strukturní typy *Amaryllidaceae* alkaloidů

Strukturní typ	Zástupce	Výskyt v rodech
<b>Galanthaminový</b>	 <p>Galanthamin</p>	<i>Galanthus, Leucojum, Lycoris, Narcissus</i>
<b>Haemanthaminový</b>	 <p>Haemanthamin</p>	<i>Haemanthus, Narcissus</i>
<b>Krininový</b>	 <p>Krinin</p>	<i>Crinum, Zephyranthes</i>
<b>Pankratistatinový</b>	 <p>Pankratistatin</p>	<i>Hymenocallis</i>
<b>Tazettinový</b>	 <p>Tazettin</p>	<i>Crinum, Galanthus, Hymenocallis, Narcissus</i>
<b>Lykorinový</b>	 <p>Lykorin</p>	<i>Galanthus, Leucojum, Lycoris, Narcissus</i>

**Homolykorinový***Clivia, Leucojum, Lycoris,  
Narcissus*

Homolykorin

**3.2.3 Rod *Galanthus***

Rostliny rodu *Galanthus*, nebo-li česky sněženek, se dělí do přibližně 19 – 20 druhů, které se dále dělí na řadu poddruhů a variet. V současné době je známo více než 500 různých vyšlechtěných kultivarů<sup>41</sup>. Tyto vytrvalé byliny s malou podzemní cibulí jsou domácí v Evropě a na Blízkém Východě (najdeme je od Pyrenejí po Írán) a kvetou převážně v období od února do dubna - často se jedná o první kvetoucí rostliny vůbec, ale najdeme i druhy, které kvetou až v létě či na podzim - na příklad *Galanthus cilicicus* nebo *Galanthus reginae-olgae*<sup>2,41</sup>.

Sněženky mají 2 – 3 přízemní široce čárkované listy a bezlistý smáčklý stvol nese jednotlivé květy tvořené dvěma kruhy po třech okvětních lístcích, přičemž vnější okvětní lístky jsou oddálené až rozestálé a delší než ty vnitřní klínovité, které jsou zakončeny žluto-zeleným až zeleným lemem a dosahují maximálně třetiny až poloviny délky lístků vnějších. Plodem je široce elipsoidní tobolka skrývající 3 semena s elaiosomem bohatým na proteiny a lipidy. Elaiosom je zkonsumován hmyzem (např. mravenci), který posléze zajistí transport zbytku semena a tím rozšíření druhu<sup>2,36,42,43</sup>. Vzhledem k nedostatku jednoznačně charakterizovatelných morfologických znaků a jejich vysoké variabilitě není snadné rozlišit jednotlivé druhy tohoto rodu. Nakonec k jejich jasnému rozlišení došlo na základě morfologické, fytochemické a DNA analýzy, díky nimž bylo rozpoznáno 19 druhů, 6 variet a 2 mezidruhové hybridy<sup>2</sup>:

1. *Galanthus alpinus* Sosn.*Galanthus alpinus* var. *alpinus*.*Galanthus alpinus* var. *bortkewitschianus* (Koss) A.P. Davis2. *Galanthus angustifolius* Koss3. *Galanthus cilicicus* Baker

4. *Galanthus elwesii* Hook.  
*Galanthus elwesii* var. *elwesii*  
*Galanthus elwesii* var. *monostictus* P.D.Sell
5. *Galanthus fosteri* Baker
6. *Galanthus gracilis* Celak.
7. *Galanthus ikariae* Baker
8. *Galanthus koenenianus* Lobin
9. *Galanthus krasnovii* Khokhr.
10. *Galanthus lagodechianus* Kem.-Nath.
11. *Galanthus nivalis* L.
12. *Galanthus peshmenii* A.P.Davis & C.D.Brickell
13. *Galanthus platyphyllus* Traub & Moldenke
14. *Galanthus plicatus* M.Bieb.
15. *Galanthus reginae-olgae* Orph.  
*Galanthus reginae-olgae* subsp. *reginae-olgae*.  
*Galanthus reginae-olgae* subsp. *vernalis* Kamari
16. *Galanthus rizehensis* Stern
17. *Galanthus transcaucasicus* Fomin
18. *Galanthus trojanus* A.P.Davis & Özhatay
19. *Galanthus woronowii* Losinsk.
20. *Galanthus* × *allenii* Baker, (*G. alpinus* × *G. woronowii*)
21. *Galanthus* × *valentinei* Beck, (*G. plicatus* × *G. nivalis*)

Všechny tyto druhy a variety jsou chráněny v rámci Úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a rostlin (Convention on International Trade in Endangered Species, CITES). Rostliny rodu *Galanthus* jsou zaneseny v Příloze II (v Evropě v Příloze B), což v obou případech odpovídá tomu, že obchodování s těmito rostlinami je na mezinárodní úrovni omezeno a pod dozorem<sup>44</sup>. Jakýkoliv obchod s volně rostoucími rostlinami rodu *Galanthus*, či jejich částmi je bez povolení CITES nelegální<sup>2</sup>. V současné době je povolen jen omezený vývoz cibulí sbíraných ve volné přírodě Turecka a navíc pouze u tří druhů, jimiž jsou *Galanthus nivalis*<sup>43</sup>, *Galanthus elwesii* a *Galanthus woronowii*<sup>45</sup>. Toto omezení je na místě, neboť právě

sněženky jsou jedny z nejobchodovanějších volně rostoucích okrasných rostlin, což je dáno faktem, že jsou oblíbené pro svou zdobnost i kvůli roli poslů jara.

Nejznámějšími druhy jsou *Galanthus nivalis* a *Galanthus elwesii*, z nichž se také šlechtí nejvíce kultivarů<sup>41</sup>. Tyto kultivary (mj. *G. nivalis* cv. FLORE PLENO, *G. nivalis* cv. IRISH GREEN, *G. nivalis* VIRIDI-APICE, *G. elwesii* cv. COMET, *G. elwesii* cv. GODFREY OWEN, *G. elwesii* cv. WHITE PERFECTION, **Obr. 6A -F**) jsou šlechtěny hlavně pro dekorativní účely, ale fytochemické studie prokázaly, že některé z nich mohou být zajímavým zdrojem pro izolaci již známých látek nebo jako zdroj látek ještě neidentifikovaných<sup>46</sup>. V následujícím textu bude zmíněno několik druhů rodu *Galanthus* a nejvýznamnějších alkaloidů, které obsahují.



**A** *G. nivalis* cv. FLORE PLENO<sup>47</sup>

**B** *G. nivalis* cv. IRISH GREEN<sup>48</sup>



**C** *G. nivalis* VIRIDI-APICE<sup>47</sup>

**D** *G. elwesii* cv. COMET<sup>49</sup>



E *G. elwesii* cv. GODFREY OWEN<sup>50</sup> F *G. elwesii* cv. WHITE PERFECTION<sup>51</sup>

**Obr. 6** Vybrané kultivary *G. nivalis* a *G. elwesii*

### 3.2.3.1 *Galanthus nivalis* L.

Tento druh, česky nazývaný sněžěnka podsněžník, je jediným volně rostoucím druhem sněžěnky, se kterým se můžeme setkat na území ČR. *G. nivalis* bývá první kvetoucí rostlinou, kterou je po zimě možné spatřit, neboť kvete od února do května. Bývá vysoká přibližně 10 – 30 cm a vzpřímený stonek obvykle nese jeden nící květ – tři vnější okvětní lístky výrazně přesahují 3 okvětní lístky vnitřní, které mají zelený lem<sup>43,52</sup> (**Obr. 7**). Tento druh je dosti variabilní a je možné narazit i na květy vícečetné. Listy jsou dva široce čárkovité a přízemní a třetí list je redukován na blanitou pochvu, která na bázi dužnatí v novou cibuli<sup>36</sup>.

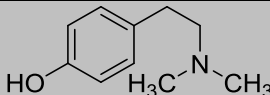
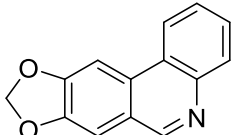
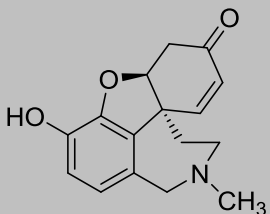
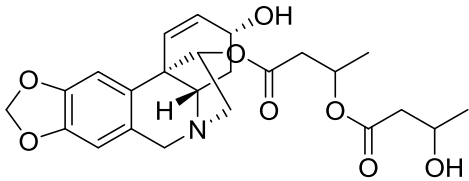


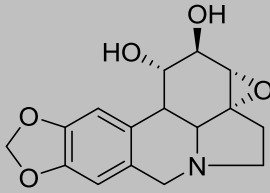
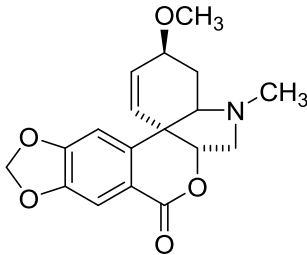
**Obr. 7** *Galanthus nivalis*<sup>53</sup>

Rostliny tohoto druhu byly první, z nichž byl izolován galanthamin pro výrobu léčivého přípravku s názvem Nivalin®, i když byl poprvé identifikován a popsán roku 1955 v *Galanthus woronowii*. V současné době se galanthamin izoluje hlavně z *Leucojum aestivum*<sup>5</sup> a některých druhů narcisů, neboť jejich cibule jsou větší a rostlinný materiál je tedy snáze dostupný.

Složení a množství jednotlivých alkaloidů v sumárním alkaloidním extraktu izolovaném z rostliny je závislé na době sběru, vegetačním období rostliny, povětrnostních a pedologických podmínkách i geografickém výskytu. Proto se může celkem markantně lišit i mezi jednotlivými rostlinami téhož druhu – vzniká vnitrodruhová variabilita<sup>54</sup>. Byla provedena řada fytochemických studií zabývajících se obsahem AmA v různých populacích *G. nivalis*<sup>54-56</sup>. Byly identifikovány alkaloidy různých strukturních typů – tyraminového, narciklasinového, galanthaminového, haemanthaminového, lykorinového i tazettinového (viz **Tab. 2**) v různých poměrech, ale nikde nebyly detekovány alkaloidy homolykorinového strukturního typu.

**Tabulka 2** Alkaloidy *Galanthus nivalis*

Strukturní typ	Vzorová struktura	Zástupci
<b>Tyraminový</b>	 <p>Hornedin</p>	Hornedin + deriváty
<b>Pankratistatinový</b>	 <p>Trisphaeridin</p>	Ismin Trisphaeridin
<b>Galanthaminový</b>	 <p>Narwedine</p>	Galanthamin Lykoramin Narwedine 3-Epigalanthamin N-Demethylgalanthamin
<b>Haemanthaminový</b>		Haemanthamin, deriváty Hydroxybutanoylhamaynu

	11,3'-O-(3',3''- Dihydroxybutanoyl)hamayn	
<b>Lykorinový</b>		Anhydrolykorin Inkartin Galanthin Lykorin Dihydrolykorin 11,12- Didehydryanhydrolykorin
<b>Tazettinový</b>		6-O-Methylpretazettin 11-Deoxytazettin Tazettin Makronin Epimakronin

### 3.2.3.2 *Galanthus trojanus* A.P.Davis & Özhatay

Rostliny tohoto druhu jsou domácí na severozápadě Turecka a jsou velmi podobné druhům *G. nivalis* a *G. rizehensis*, ale jsou zde znaky, podle kterých je lze od sebe rozpoznat. *Galanthus trojanus* (**Obr. 8**) má širší listy (0,8 – 1,6 cm) než oba zmíněné druhy (0,4 – 1 cm) a jejich povrch je tmavší a matný. Dalším rozlišovacím znakem mohou být zelené značky na kratších vnitřních okvětních lístcích a jejich odlišný tvar. U *G. nivalis* mívají tvar ostrého V, u *G. rizehensis* spíše tvar U a u *G. trojanus* je to tvar široce rozevřeného V. Nepříliš často se mohou vyskytovat na každém vnitřním okvětním lístku 2 samostatné zelené skvrny. Posledním rozdílem je skutečnost, že rostliny *G. trojanus* bývají výrazně větší než běžné volně rostoucí rostliny obou zbývajících druhů<sup>57</sup>.

Stejně jako ostatní druhy rodu *Galanthus* obsahují i rostliny tohoto druhu řadu AmA s širokým spektrem biologických účinků. V jedné ze studií<sup>59</sup> bylo identifikováno 6 již známých AmA (arolykoricidin, haemanthamin, *O*-methylnorbelladin, narcidin, dihydrolykorin a 8-*O*-demethylmaritidin) a dva, do té doby nepopsané, *N*-oxidy alkaloidů – konkrétně 1-*O*-acetyldihydromethylpseudolykorin *N*-oxid a 11-hydroxyvittatin *N*-oxid. Kromě AmA byly izolovány dva další isochinolinové alkaloidy

(stylopin a protopin), kyselina nikotinová (poprvé izolována z čeledi Amaryllidaceae) a tyramin.



**Obr. 8** *Galanthus trojanus*<sup>58</sup>

Jednotlivé izolované látky byly podrobeny testům na jejich antiprotozoální aktivitu (**Tab. 3**), neboť hlavně v tropických oblastech jsou parazitická onemocnění značným problémem. Haemantamin navíc vykázal cytotoxickou aktivitu proti linii buněk lidského karcinomu (KB) ( $IC_{50} = 0,97 \mu\text{g/ml}$ ) a jeho aktivita proti linii savčích buněk (L6) byla výrazně nižší ( $IC_{50} = 7,41 \mu\text{g/ml}$ ). Cytotoxická aktivita všech izolovaných látek vůči oběma buněčným liniím byla testována proti standardu podophylotoxinu<sup>59</sup>.

**Tabulka 3** Antiparazitická aktivita vybraných alkaloidů *Galanthus trojanus*

Původce	Onemocnění	Účinné látky	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Trypanozoma brucei</i> <i>rhodesiense</i> <sup>a</sup>	spavá nemoc	arolykoricidin	5,99
		haemanthamin	3,35
		dihydrolykorin	3,10
		protopin	8,71
<i>Trypanozoma cruzi</i> <sup>b</sup>	Chagasova choroba	haemanthamin	1,80
<i>Leishmania donovani</i> <sup>c</sup>	viscerální leishmanióza		
<i>Plasmodium falciparum</i> <sup>d</sup>	malárie	arolykoricidin	4,44
		haemanthamin	2,75
		stylopin	0,23
		protopin	0,50



Standardy: <sup>a</sup>Melarsoprol (IC<sub>50</sub> = 0,004 µg/ml), <sup>b</sup>Benznidazol (IC<sub>50</sub> = 0,36 µg/ml), <sup>c</sup>Miltefosin (IC<sub>50</sub> = 0,20 µg/ml), <sup>d</sup>Chloroquin (IC<sub>50</sub> = 0,065 µg/ml)

### 3.2.3.3 *Galanthus rizehensis* Stern

Tento druh sněženky je domácí v přírodě na severovýchodě Turecka. Od výše zmíněné *G. trojanus* jsou rostliny tohoto druhu menšího vzrůstu (10 -15 cm), mají užší matně tmavé listy a zelená značka na vnitřních okvětních lístcích má tvar písmene U<sup>57</sup>.



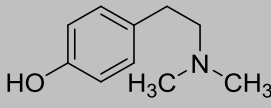
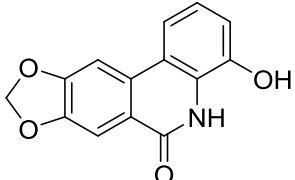
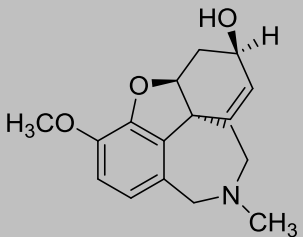
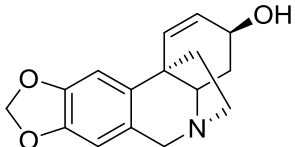
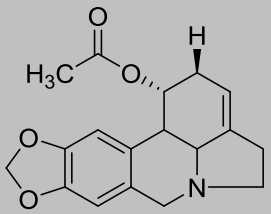
**Obr. 9** *Galanthus rizehensis*<sup>48,60</sup>

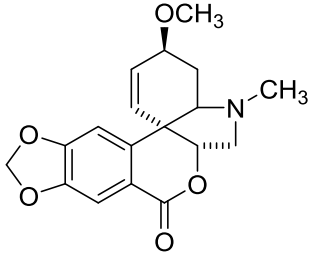
V rámci dvou fytochemických studií<sup>61,62</sup> bylo z rostlin *G. rizehensis* (**Obr. 9**) izolováno a pomocí spektroskopických metod identifikováno zatím 21 alkaloidů (viz **Tab. 4**) a dva *N*-oxidy (inkartin *N*-oxid a lykorin *N*-oxid). Ne všechny identifikované alkaloidy patřily do skupiny *Amarylidaceae* alkaloidů. V obou studiích byl izolován 1-acetyl- $\beta$ -karbolin (**Obr. 10A**), což je alkaloid patřící do skupiny  $\beta$ -karbolinových alkaloidů a vyskytuje se na příklad v housenici čínské (*Cordyceps sinensis*) nebo v aktinomycetě *Marinactinospora thermotolerans*, která byla nalezena v sedimentu Jihočínského moře.

U arolykoricidinu a narcipriminu izolovaných z *G. rizehensis* byla testována jejich aktivita vůči DNA topoisomerasám<sup>62</sup>. Oba zmíněné alkaloidy vykazaly aktivitu vůči oběma těmito enzymům, což korespondovalo i s jejich cytostatickým účinkem na buněčné linie HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu) a A431 (karcinom kůže) (**Tab. 5**). Jako standard pro porovnání cytostatické aktivity byla

použita cisplatina (**Obr. 10B**). Výzkum přesného mechanismu cytotoxického působení těchto látek teprve probíhá, ale zatím se jeví jako perspektivní pro další výzkum<sup>62</sup>.

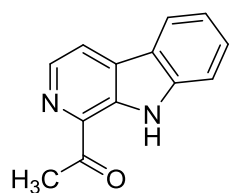
**Tabulka 4** Alkaloidy identifikované v *Galanthus rizehensis*

Strukturní typ	Vzorová struktura	Zástupci
<b>Tyraminový</b>	 <p>Hornedin</p>	<i>N</i> -trans Feruolytyramin Hornedin <i>O</i> -Methylnorbelladin
<b>Pankratistatinový</b>	 <p>Arolykoricidin</p>	Arolykoricidin Ismin Narciprimin Trisphaeridin
<b>Galanthaminový</b>	 <p>Galanthamin</p>	Galanthamin
<b>Haemanthaminový</b>	 <p>Vittatin</p>	Vittatin 11-Hydroxyvittatin
<b>Lykorinový</b>	 <p><i>O</i>-Acetylkararin</p>	Anhydrolykorin Assoanin <i>O</i> -Acetylkararin Inkartin Galanthin Hippamin Lykorin Sternbergin

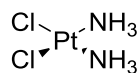
<b>Tazettinový</b>		Epimakronin Tazettin
	Epimakronin	

**Tabulka 5** Antineoplastická aktivita vybraných alkaloidů *Galanthus rizehensis*

Látka	IC <sub>50</sub> (μM) HeLa	IC <sub>50</sub> (μM) MCF7	IC <sub>50</sub> (μM) A431
Narciprimin	20,42	26,47	>30
Arolykoricidin	>30	>30	>30
Cisplatina	12,43	9,63	2,84



**A**



**B**

**Obr. 10** Struktura 1-acetyl-β-karbolinu (**A**) a cisplatiny (**B**)

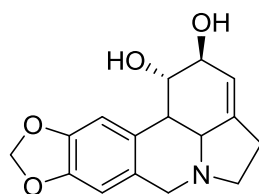
### 3.2.3.4 Vybrané alkaloidy rodu *Galanthus*

V současné době je nejpoužívanější látkou izolovanou z čeledi *Amaryllidaceae* galanthamin, o němž je více zmíněno výše v části o terapii AD. Rostliny druhu *Galanthus* obsahují široké spektrum AmA, jak je ostatně zmíněno v předcházejícím textu, proto jsem vybrala pouze dva zástupce, kteří se projevují různými odlišnými biologickými aktivitami a účinky na lidský organismus.

#### 3.2.3.4.1 Lykorin

Tento pyrrolofenanthridinový cyklický alkaloid – systematickým názvem 2,4,5,7,12b,12c-hexahydro-1H-(1,3)dioxolo(4,5-j)-pyrrolo(3,2,1-de)phenanthridine-1-diol, (**Obr. 11**) byl jako první z AmA izolován již v roce 1877 z rostlin druhu

*Narcissus pseudonarcissus* a jeho struktura byla popsána roku 1956. Lykorin je biosyntetizován v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae* norbelladinovou cestou (viz **Obr. 5**) a řadíme ho do skupiny alkaloidů lykorinového strukturního typu. Jde o hlavní obsahovou látku dalšího z druhů čeledi *Amaryllidaceae* – *Lycoris radiata*<sup>63</sup>. Tato rostlina je součástí tradiční čínské medicíny, proto je paleta velmi různorodých biologických účinků lykorinu dobře známa – u rostlin například blokuje tvorbu kys. askorbové. Dalšími jsou mj. účinky protizánětlivé; antibakteriální; antivirové – působí proti viru pravých neštovic, polioviru, HIV-1 viru, viru ptačí chřipky H5N1 nebo proti SARS-asociovanému koronaviru; antimykotické; antimalarické<sup>63</sup> a antiparazitické – účinkuje proti prvoku *Trypanosoma brucei*<sup>4</sup>, který v Africe způsobuje spavou nemoc. Proti tomuto prvoku je účinný i derivát lykorinu – dihydrolykorin<sup>59</sup>.



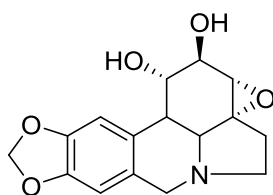
**Obr. 11** Struktura lykorinu

Další, velmi významnou biologickou aktivitou lykorinu je aktivita antineoplastická. Výhodou cytotoxicky působících AmA je fakt, že jsou specifické vůči zhoubně bujícím nádorovým buňkám, ale ostatní buňky organismu nijak významně neovlivňují. Lykorin, stejně jako řada jeho derivátů a dalších AmA, jsou předmětem intenzivního výzkumu, jehož cílem je nalézt co nejširší spektrum látek účinných a použitelných v antineoplastické terapii, neboť v léčbě velkého množství nádorů zatím není současná medicína účinná, protože ještě nejsou známy všechny efluxní, metabolické a jiné mechanismy, jimiž může být nádor 'vybaven'<sup>64</sup>. Velkým problémem je, že buněčný cyklus množství nádorů je rezistentní k přechodu do apoptotické fáze, proto je velký zájem o to, najít co nejvíce látek, které dovedou buněčnou smrt indukovat<sup>4</sup>, a právě do této skupiny spadají látky ze skupiny AmA. Dalším problémem je vznik multilékové rezistence v průběhu terapie, takže je dobré mít k dispozici co nejširší škálu těchto léčiv<sup>65</sup>. Mechanismus, jakým lykorin indukuje apoptózu<sup>63</sup>, je komplexní. Zahrnuje inhibici proteosyntézy, interakci s dvoušroubovicí DNA, up-regulací proapoptotických kaspas 3, 7 a 9 a současnou down-regulací inhibitorů apoptózy - proteinů Mcl-1 a Bcl-x1<sup>4,64</sup>. Další z faktorů, které napomáhají antineoplastickému účinku lykorinu, je i

současná inhibice angiogeneze v nádoru, což zpomalí růst nádoru a jeho metastázování v organismu<sup>63</sup>. Bylo zjištěno, že pro antineoplastickou aktivitu AmA jsou potřeba následující strukturní znaky: kladně nabitý atom dusíku (vzniká při přeměně na aktivní metabolit), planární molekula (důležitá vzhledem k interakci s DNA) a alkokyskupina (zvyšuje aktivitu v procesech zasahujících do buněčného metabolismu) – proto je 1-*O*-acetyllykorin v *in vitro* testech účinnější než lykorin<sup>64</sup>. Cytotoxická aktivita lykorinu byla poprvé popsána již v roce 1976 a od té doby byla jeho aktivita i aktivita mnoha jeho derivátů, kterých je kolem tří set, *in vitro* testována na množství různých buněčných liniích a i *in vivo* na myších<sup>64</sup>. Výhodou lykorinu a jeho derivátů je již zmíněná skutečnost, že jejich účinek na normální buňky organismu je výrazně nižší. Jedním z nejčastějších nežádoucích účinků je nauzea a zvracení<sup>63</sup>, při závažné intoxikaci může způsobit respirační depresi až zástavu dechu<sup>39</sup>.

#### 3.2.3.4.2 Inkartin

Inkartin patří mezi AmA lykorinového typu a jeho strukturu je možno vidět na **Obr. 12**. Poprvé byl izolován a popsán v komplexu alkaloidů izolovaných z rostliny *Lycoris incarnata*, která také náleží do čeledi *Amaryllidaceae*, ale lze jej nalézt i v *Galanthus elwesii*<sup>66</sup>. Aktivita inkartinu ( $IC_{50} = 102 \mu\text{M}$ ) vůči HuAChE je přibližně dvacetkrát nižší než u galanthaminu ( $IC_{50} = 5,14 \mu\text{M}$ ), který byl použit jako pozitivní kontrola<sup>67</sup>. Naproti tomu vykázal inkartin významnou inhibiční aktivitu proti POP -  $IC_{50} = 0,91 \pm 0,09 \text{ mM}$  (standard bajkalin -  $IC_{50} = 0,61 \pm 0,02 \text{ mM}$ ), což z něj činí látku zajímavou pro další výzkum<sup>68</sup>.



**Obr. 12** Struktura inkartinu

#### 3.2.4 Rod *Leucojum*

Rostliny tohoto rodu jsou podobné rostlinám rodu *Galanthus*, ale existují znaky, podle nichž jsou od sebe snadno odlišitelné. Rostliny rodu *Leucojum* (nebo česky bledulí) jsou, stejně jako sněženky, vytrvalé byliny s podzemní cibulí. Listy jsou čárkovité až páskovité, širší a je jich 2 – 5. Hlavním odlišným znakem je květ složený ze dvou kruhů

po 3 stejných okvětních lístcích nesoucích zelené či žluté značky, zatímco u sněženek se okvětní lístky v obou kruzích značně liší. Sněženky zpravidla na jednom stonku nesou 1 – 2 květy, ale u některých druhů bledulí (*Leucojum aestivum*) může jeden stonek nést květů až 7. Plodem je kulovitá až elipsoidní tobolka. Je známo celkem 10 – 11 druhů rodu *Leucojum* vyskytujících se v Evropě, jihozápadní Asii a na severu Afriky<sup>36,69,70</sup>.

1. *Leucojum aestivum* L.

*Leucojum aestivum* subsp. *aestivum*

*Leucojum aestivum* subsp. *pulchellum*

2. *Leucojum autumnale* L.

3. *Leucojum fabrei* Quézel & Girerd

4. *Leucojum ionicum* Kit Tan, Mulla, Sfikas & Strid

5. *Leucojum longifolium* (J.Gay ex M.Roem.) Gren.

6. *Leucojum nicaeense* Ardoino

7. *Leucojum roseum* F.Martin

8. *Leucojum tingitanum* Baker

9. *Leucojum trichophyllum* Schousb.

10. *Leucojum valentinum* Pau

11. *Leucojum vernalis* L.

*Leucojum vernalis* subsp. *carpathicum* (Sims) K.Richt.

Na základě novějších fylogenetických studií bylo devět druhů rodu *Leucojum* vyčleněno do rodu *Acis*, neboli bledulek, a v původním rodu zůstaly pouze *Leucojum aestivum* a *Leucojum vernalis*<sup>69,70</sup>.

### 3.2.4.1 *Leucojum aestivum* L.

Tato rostlina – česky bledule letní - začíná kvést na konci dubna/začátkem května, což je rozdíl oproti *Leucojum vernalis* (bleduli jarní), která kvete na přelomu února/března. Jeden stonek obvykle nese 2 – 5 zvonkovitých květů, ale někdy jich může být až 8 najednou. Špičky okvětních lístků nesou žlutozelenou značku<sup>47</sup> (viz **Obr. 13**). Oproti sněženkám je *Leucojum aestivum* výrazně větší – stonek může měřit až kolem 50 cm a i

listy jsou širší a je jich více (zpravidla 3 – 6). Plodem je kulovitá tobolka nesoucí semena bez elaiosomu<sup>36,71</sup>.

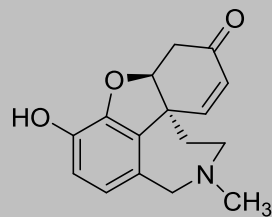
Již od šedesátých let minulého století se rostliny a posléze tkáňové kultury *Leucojum aestivum* používají k průmyslové izolaci galanthaminu. Kromě něj byla ovšem v alkaloidních extraktech identifikována celá řada dalších AmA různých strukturních typů<sup>72-74</sup>, které jsou shrnuty v následující tabulce (**Tab. 6**). *N*-alkylované deriváty byly testovány na inhibici HuAChE a jejich aktivita vůči tomuto enzymu byla vyšší než u galanthaminu ( $IC_{50, \text{HuAChE}} = 1,82 \mu\text{M}$ ), který byl testován společně s těmito látkami. Aktivita *N*-allylnorgalanthaminu ( $IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,18 \mu\text{M}$ ) i *N*-(14-methylallyl)norgalanthaminu ( $IC_{50, \text{HuAChE}} = 0,16 \mu\text{M}$ ) byla přibližně desetkrát větší, což z těchto derivátů galanthaminu činí látky perspektivní pro další výzkum<sup>73</sup>.



**Obr. 13** *Leucojum aestivum*<sup>47</sup>

**Tabulka 6** Alkaloidy izolované z *Leucojum aestivum*

Strukturní typ	Vzorová struktura	Zástupci
Galanthaminový	<p><i>N</i>-Demethylgalanthamin</p>	<p>Galanthamin</p> <p><i>N</i>-Allylnorgalanthamin</p> <p><i>N</i>-(14-methylallyl)Norgalanthamin</p>



Narwedín

*N*-Demethylgalanthamin

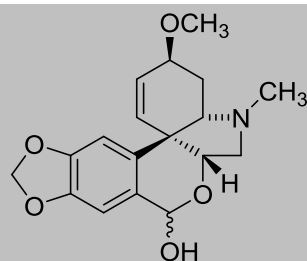
*N*-Formylnorgalanthamin

Narwedín

**Pankratistatinový**

Pankratinín

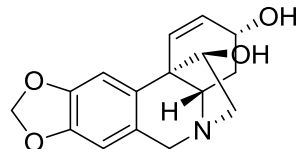
**Tazettinový**



Pretazettín

Pretazettín

**Haemanthaminový**



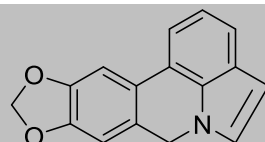
Hamayn

Haemanthamin

Hamayn

Vittatin

**Lykorinový**



11,12-Didehydroanhydrolykorin

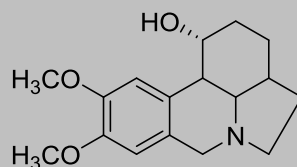
Anhydrolykorin

Acetylkararin

11,12-

Didehydroanhydrolykorin

Lykorin



Pluviin

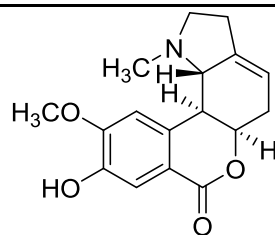
Norpluviinacetát

Pluviin

Sternbergin

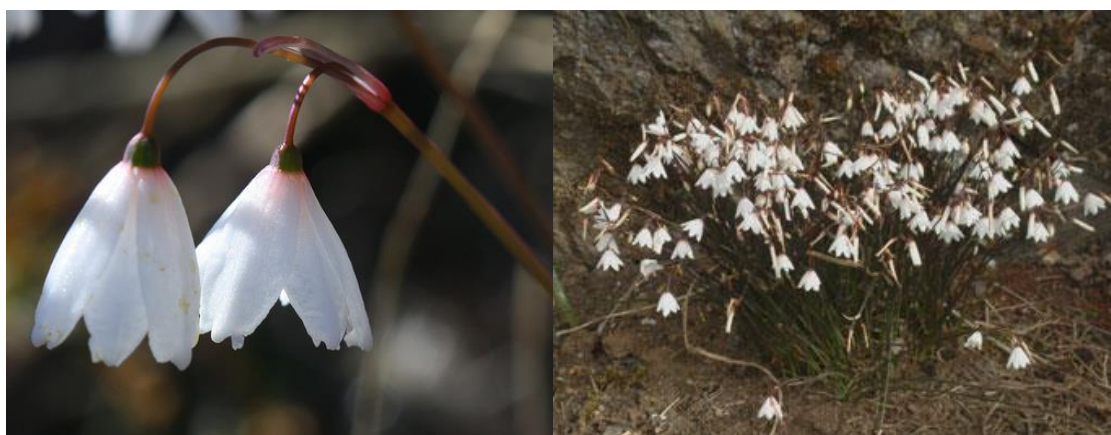
Ungiminorin + deriváty



8-*O*-Demethylhomolykorin

### 3.2.4.2 *Leucojum autumnale* L.

Tento druh je česky nazýván podzimní bledulí, ale zpravidla kvete již od srpna do října. Tato rostlina hojně roste na jihu Evropy a v Severní Africe. Jde o vytrvalou cibulovinu, jež kvete na holých stoncích – listy se objeví až po odkvětu a přezimují. Stonek je načervenalé barvy, 10 – 20 cm dlouhý a nese maximálně 3 květy. Okvětní lístky jsou bez zelené značky na okraji, ale na bazi jsou narůžovělé<sup>75</sup> (**Obr. 14**).

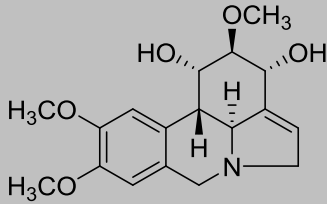
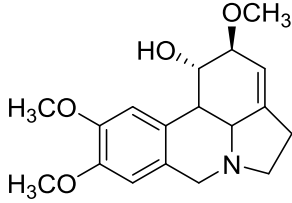
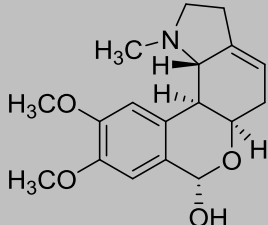


**Obr. 14** *Leucojum autumnale*<sup>75,76</sup>

Tento druh nebyl prozatím podroben širším fytochemickým studiím. S ohledem na obsah AmA byl zatím publikován pouze jeden článek<sup>77</sup>. Další analýza sumárního alkaloidního extraktu izolovaného z cibulí *Leucojum autumnale*, byla provedena v naší laboratoři a referenční vzorek byl uložen v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod označením CUFPH-16130/AL-513. Testován byl i kultivar *Leucojum autumnale* cv. SEPTEMBER SNOW – referenční vzorek uložen tamtéž pod označením CUFPH-16130/AL-514<sup>78</sup>. V obou

studiiích byly identifikovány hlavně alkaloidy lykorinového a pankratistatinového strukturního typu<sup>77</sup> - viz **Tab 7**.

**Tabulka 7** Alkaloidy izolované z *Leucojum autumnale*

Strukturní typ	Vzorová struktura	Zástupci
<b>Pankratistatinový</b>	 <p>Narcissidin</p>	<p>Narcissidin</p> <p>3-<i>O</i>-Narcissidin</p> <p>3-<i>O</i>-Narcissidin <i>N</i>-oxid</p>
<b>Lykorinový</b>	 <p>Galanthin</p>	<p>11,12-Didehydroanhydrolykorin</p> <p>Dehydroassoanin</p> <p>Galanthin</p> <p>Lykorin</p>
<b>Homolykorinový</b>	 <p>Lykorenin</p>	<p>Lykorenin</p>

### 3.2.4.3 Vybrané alkaloidy rodu *Leucojum*

Stejně jako sněženky i bledule obsahují celou řadu biologicky aktivních látek. V následujícím textu budou zmíněny dva zástupci AmA, kteří se jeví jako perspektivní.

#### 3.2.4.3.1 Homolykorin

Homolykorin (**Obr. 15**) je jedním z AmA homolykorinového strukturního typu, který se odvozuje od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. V různých studiích byla testována cytotoxická aktivita homolykorinu vůči rozličným liniím buněk – např. Molt 4, HepG 2, LMTK<sup>79</sup>, z nichž proti prvním dvěma zhoubně bujícím liniím byl prakticky neúčinný, jak je vidět v **Tab. 8**. Linie LMTK je ale bohužel linií nenádorových buněk myších

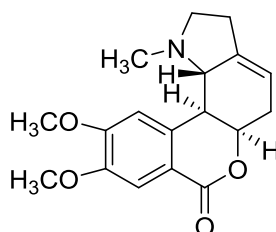
fibroblastů a cytotoxicita vůči nim není žádoucí, leč ji vykazují i další AmA homolykorinového strukturního typu<sup>4</sup>. Jako standard pro měření byl použit vinkristin sulfát<sup>79</sup>. Další testované linie byly mj. buňky HeLa, MCF7, A431, L5178 MDR a L5178 PAR. Zde byly jako standardy použity doxorubicin a cisplatina<sup>65</sup>, jak je uvedeno v **Tab. 9**.

**Tabulka 8** Antineoplastická aktivita homolykorinu<sup>79</sup>

	<b>Molt 4</b>	<b>HepG2</b>	<b>LMTK</b>
<b>Homolykorin</b>	ED <sub>50</sub> > 50 µg/mL	ED <sub>50</sub> > 50 µg/mL	ED <sub>50</sub> = 0,5 µg/mL
<b>Vinkristin sulfát</b>	ED <sub>50</sub> = 0,04µg/mL	ED <sub>50</sub> = 0,01µg/mL	ED <sub>50</sub> = 0,01 µg/mL

**Tabulka 9** Antineoplastická aktivita homolykorinu<sup>65</sup>

	<b>HeLa</b>	<b>MCF7</b>	<b>A431</b>	<b>L5178 MDR</b>	<b>L5178 PAR</b>
<b>Homolykorin</b>	IC <sub>50</sub> > 30 µM	nedef.	nedef.	IC <sub>50</sub> = 69,13 µM	IC <sub>50</sub> = 28,51 µM
<b>Doxorubicin</b>	IC <sub>50</sub> = 0,154 µM	IC <sub>50</sub> = 0,279 µM	IC <sub>50</sub> = 0,149 µM	IC <sub>50</sub> = 1,097 µM	nedef.
<b>Cisplatina</b>	IC <sub>50</sub> = 12,43 µM	IC <sub>50</sub> = 9,630 µM	IC <sub>50</sub> = 2,835 µM	nedef.	nedef.



**Obr. 15** Struktura homolykorinu

V naší laboratoři byl homolykorin izolován pomocí preparativní TLC (To : Et<sub>2</sub>NH, 95 : 5) ze sumárního extraktu *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN a byly změřeny jeho

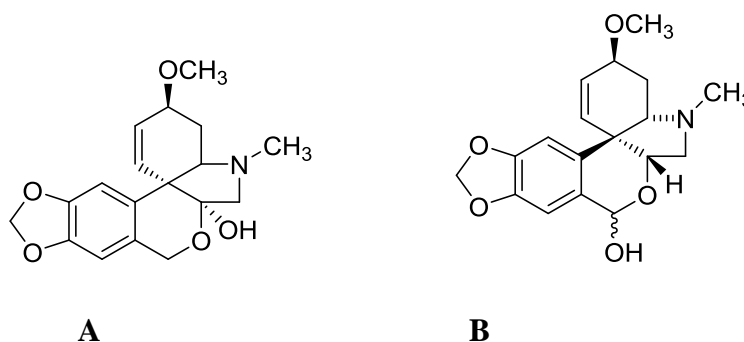
aktivity vůči cholinesterasám a POP. Inhibice cholinesteras byly porovnávány s galanthaminem a hodnoty vyšly následující: HuAChE ( $IC_{50} = 63,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$ ) a HuBuChE ( $IC_{50} = 151,0 \pm 15,2 \mu\text{M}$ ). Inhibice POP byla měřena vůči standardu Z-Proprinalu ( $IC_{50,POP} = 3,27 \cdot 10^{-3} \pm 0,02 \cdot 10^{-3} \text{ nM}$ ) a inhibiční aktivita homolykorinu byla  $IC_{50,POP} = 173 \pm 40,6 \mu\text{M}$ <sup>78</sup>.

### 3.2.4.3.2 Tazettin

Tento alkaloid (**Obr. 16A**) patří mezi AmA tazettinového strukturního typu, což jsou deriváty 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu. Stejně jako u homolykorinu byla v různých studiích jeho biologická aktivita testována na několika buněčných liniích zhoubně bujících buněk, jako jsou Molt 4 a HepG2. Jako standard byl použit vinkristin sulfát a aktivita obou látek proti zmíněným liniím je zanesena v **Tab. 10**. V této tabulce je vidět, že účinek tazettinu vůči těmto liniím je velmi slabý, ale na rozdíl od homolykorinu má alespoň menší vliv na zdravé buňky myších fibroblastů (LMTK), přičemž aktivita vinkristin sulfátu proti těmto buňkám je velmi nízká<sup>79</sup>.

**Tabulka 10** Antineoplastická aktivita tazettinu<sup>79</sup>

	Molt 4	HepG2	LMTK
<b>Tazettin</b>	$ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$	$ED_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$	$ED_{50} = 3,2 \mu\text{g/mL}$
<b>Vinkristin sulfát</b>	$ED_{50} = 0,04 \mu\text{g/mL}$	$ED_{50} = 0,01 \mu\text{g/mL}$	$ED_{50} = 0,01 \mu\text{g/mL}$



**Obr. 16** Struktura tazettinu (**A**) a pretazettinu (**B**)

Mnohem účinnějším proti nádorovým buňkám se ukázal být prekurzor v syntéze tazettinu – pretazettin (**Obr. 16B**). Ten vykázal zajímavou aktivitu vůči buňkám linií

HeLa, MCF7, A431, L5178 MDR a L5178 PAR. Zde byly jako standardy použity doxorubicin a cisplatina. Aktivity všech tří látek jsou uvedeny v **Tab. 11**. Tato studie prokázala, že pretazettin je proti HeLa, MCF7 a L5178 PAR liniím účinnější než cisplatina, což z něj činí látku perspektivní pro další výzkum<sup>65</sup>. Také patří mezi neúčinnější z alkaloidů testovaných na linii Molt 4<sup>4</sup>.

**Tabulka 11** Antineoplastická aktivita pretazettinu<sup>65</sup>

	<b>HeLa</b>	<b>MCF7</b>	<b>A431</b>	<b>L5178 MDR</b>	<b>L5178 PAR</b>
<b>Pretazettin</b>	IC <sub>50</sub> = 8,853 μM	IC <sub>50</sub> = 7,869 μM	IC <sub>50</sub> = 5,373 μM	IC <sub>50</sub> = 4,12 μM	IC <sub>50</sub> = 0,7989 μM
<b>Doxorubicin</b>	IC <sub>50</sub> = 0,154 μM	IC <sub>50</sub> = 0,279 μM	IC <sub>50</sub> = 0,149 μM	IC <sub>50</sub> = 1,097 μM	ne def.
<b>Cisplatina</b>	IC <sub>50</sub> = 12,43 μM	IC <sub>50</sub> = 9,630 μM	IC <sub>50</sub> = 2,835 μM	ne def.	ne def.

Byla také změřena aktivita tazettinu vůči acetylcholinesterase - IC<sub>50, HuAChE</sub> = 705 ± 63 μM<sup>37</sup>.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Všeobecné postupy

### 4.1.1 Destilace a odpařování

Všechna použitá rozpouštědla byla předem předestilována. Destilační předek (cca 5 %) byl zachycen – většinou s vodným azeotropem a poté bylo destilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Všechna rozpouštědla byla uchovávána v hnědých lahvích.

Odpařování rozpouštědel z extraktů bylo prováděno pomocí vakuové odparky LABOROTA 4001-efficient, Heidolph, Germany vybavené vodní lázní při 40 °C za sníženého tlaku.

### 4.1.2 Materiál a vybavení

#### 4.1.2.1 Rozpouštědla

Diethylether, p. a. PentaEthanol 95 %, denaturovaný methanolem, p. a. Penta

Ethylacetát, p. a. Penta

Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.2.2 Chemikálie

HCl (Lachema)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lachema)

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Lachema)

## 4.2 Příprava sumárních extraktů a GC/MS stanovení

### 4.2.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostlin *Galanthus elwesii*, *Galanthus woronowii*, *Leucojum aestivum* cv GRAVETYE GIANT, *Leucojum vernalis*, *Narcissus* cv PROFESSOR EINSTEIN, *Narcissus* cv QUIRINUS a *Narcissus* cv VIRGINIA SUNRISE byly získány od prodejce Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace rostlinného materiálu byla provedena Prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a kontrolní vzorky jsou uloženy v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod následujícím označením: *Galanthus elwesii* CUFPH-16130/AL-468; *Galanthus woronowii* CUFPH-16130/AL-516; *Leucojum aestivum* cv.

GRAVETYE GIANT CUFPH-16130/AL-441; *Leucojum vernum* CUFPH-16130/AL-472; *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN CUFPH-16130/AL-447; *Narcissus* cv. QUIRINUS CUFPH-16130/AL-448; *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE CUFPH-16130/AL-449.

#### 4.2.2 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu

Cibule rostlin vybraných rodů čeledi Amaryllidaceae byly rozdrobněny a zmrazeny, aby nedošlo ke kvantitativní a kvalitativní změně obsahových látek. V čas potřeby byl rostlinný materiál přenesen do destilační baňky a převrstven odpovídajícím množstvím 95 % ethanolu (EtOH) tak, aby hladina byla přibližně 1 – 2 cm nad hmotu rostlinného materiálu. Směs v baňce byla na vodní lázni pod zpětným chladičem přivedena k varu a vařena po dobu 20 minut. Po této době byl obsah baňky zchlazen a ethanolický extrakt byl zfiltrován přes vrstvu křemeliny, která byla předem promyta destilovanou vodou od prachových částic. Rostlinný materiál byl v baňce opět převrstven dalším množstvím 95% EtOH, přiveden k varu, vařen po dobu 20 minut a zfiltrován přes křemelinu. Tento postup byl u každého vzorku proveden celkem třikrát. Všechny zfiltrované ethanolické extrakty byly spojeny do jedné destilační baňky a odpařeny na vakuové odparce do sucha.

Odparek byl rozpuštěn v potřebném množství 2 % kyseliny chlorovodíkové (HCl) a převeden do dělicí nálevky. Baňka byla vypláchnuta diethyetherem (Et<sub>2</sub>O), který byl také převeden do dělicí nálevky. Po protřepání směsi a ustálení rovnováhy byla oddělena spodní vodná vrstva od vrstvy Et<sub>2</sub>O s vyextrahovanými lipofilními nečistotami. Tato extrakce nečistot z vodné vrstvy vždy do čistého Et<sub>2</sub>O byla provedena celkem třikrát a použitý Et<sub>2</sub>O byl jímán do odpadní baňky. Poté byla dělicí nálevka promyta destilovanou vodou a byla do ní navracena vodná vrstva, ke které byl přidán ethylacetát (EtOAc) a 10 % uhličitan sodný (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) v množství potřebném k alkalizaci kyselé vodné vrstvy na pH ~ 9 – 10. Celá směs byla protřepána a po ustanovení rovnováhy byla odpuštěna spodní vodná vrstva, aby mohla být získána horní EtOAc vrstva. Tato byla jímána do baňky s bezvodým síranem sodným (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), který sloužil jako sušidlo. Vodná vrstva byla protřepána čerstvým EtOAc celkem třikrát, aby došlo k převedení všech alkaloidů do organické vrstvy. Spojené EtOAc výtřepky byly zfiltrovány přes filtrační papír, z důvodu odstranění sušidla. Čistý extrakt byl zakoncentrován na vakuové odparce. Zakoncentrovaný extrakt byl Pasteurovou pipetou



převeden do 2 zvážených ampulí a rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha tak, aby v každé ampuli bylo přibližně 10 mg suchého alkaloidního extraktu. Zbytek extraktu byl případně odpařen do sucha v penicilince. Všechny ampule i penicilinky byly ve vakuovém exsikátoru zbaveny zbývající vlhkosti a znovu zváženy.

#### **4.2.3 GC/MS analýza**

Analýza alkaloidních extraktů vybraných druhů rostlin byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 inert pracující s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separace byla prováděna na koloně HP-5 MS (30m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Byl použit následující teplotní program: 100 °C – 180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180 – 300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Nástřík vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1  $\mu$ l methanolického roztoku sumárního extraktu (koncentrace 1 mg/ $\mu$ l) při splitu 1:10.

Alkaloidy byly identifikovány porovnáváním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty publikovanými v literatuře a se standardy látek, které byly v naší laboratoři již izolovány.

### **4.3 Měření inhibiční aktivity sumárních extraktů vůči HuAChE a HuBuChE**

#### **4.3.1 Chemikálie a materiál**

##### **4.3.1.1 Chemikálie**

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (10mM roztok)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (10mM roztok)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq$  98 % (Sigma-Aldrich) (5mM roztok)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

#### **4.3.1.2 Pufry**

5mM Fosfátový pufr pH 7,4

5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

#### **4.3.1.3 Materiál**

Zdrojem acetylcholinesterasy byl hemolyzát lidských erytrocytů, zdrojem butyrylcholinesterasy lidská plazma. Měření bylo provedeno na mikrotitračních destičkách.

#### **4.3.2 Přístroj použitý ke stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity**

Reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

#### **4.3.3 Podmínky měření**

Teplota 37 °C

Prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)

Vlnová délka spektrofotometru 436 nm (HuAChE) a 412 nm (HuBuChE)

Mikrotitrační destičky

#### **4.3.4 Příprava hemolyzátu**

Erytrocyty byly získány z čerstvě odebrané lidské krve s přidavkem citrátu sodného jako protisrážlivého činidla (18 ml krve + 2 ml 3,4 % roztoku citrátu). Citrátovaná krev byla rozdělena do zkumavek po 5 ml a byla provedena centrifugace při rychlosti 4000 ot./min, teplotě 4 °C a déce trvání 10 minut za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Po centrifugaci byla odebrána ze zkumavek plazma, která byla uchována při 4 °C pro stanovení aktivity HuBuChE (nejdéle 6 hodin). Pomocí bezpopelného filtračního papíru byl odsát zbytek plazmy. Po změření objemu erytrocytární masy byl přidán 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného a erytrocyty jím byly celkem třikrát promyty pomocí centrifugace (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly smíchány s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) v poměru 1 : 9 (pufr : erytrocyty) a nechaly se spontánně hemolyzovat. Po ukončení této řízené hemolýzy se okamžitě změří aktivita vzniklého hemolyzátu a případně je 5mM fosfátovým pufrům upravena jeho absorbance na

hodnotu 0,08–0,15 a naředěný hemolyzát je uchováván do doby použití při teplotě -22 °C. Cholinesterasová aktivita plazmy je stanovena stejným způsobem (hodnota absorbance musí být v rozmezí 0,15–0,20) a získaná plazma je uchovávána stejným způsobem jako hemolyzát.

#### **4.3.5 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC<sub>50</sub>)**

Pro stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty slouží estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Byla stanovena koncentrace SH- skupin thiocholinu, které se vážou na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm (HuAChE) nebo 412 nm (HuBuChE). Byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky cholinesterasové aktivity stanovovaných sumárních alkaloidních extraktů byly porovnány s hodnotami IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesteras: galanthaminem (IC<sub>50,HuAChE</sub> = 1,71 ± 0,07 μM, IC<sub>50,HuBuChE</sub> = 42,30 ± 1,30 μM), huperzinem A (IC<sub>50,HuAChE</sub> = 0,033 ± 0,001 μM, IC<sub>50,HuBuChE</sub> >1000 μM) a eserinem (IC<sub>50,HuAChE</sub> = 0,063 ± 0,001 μM, IC<sub>50,HuBuChE</sub> = 0,130 ± 0,004 μM). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce:

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

kde  $\Delta A_{BL}$  značí nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a  $\Delta A_{SA}$  je nárůst absorbance měřeného vzorku.

##### **4.3.5.1 Stanovení aktivity enzymů**

Do jamek mikrotitračních destiček se v případě měření aktivity enzymů napipetuje 8,3 μl plazmy nebo hemolyzátu, přidá se 283 μl 5 mM DTNB, 8,3 μl DMSO (6 jamek vedle sebe), po promíchání na mikrotřepače po dobu jedné minuty se směs inkubuje v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut, potom se přidá 33,3 μl roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10mM butyrylthiocholinjodidu) a zjistí se při příslušné vlnové délce absorbance (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm)

absorbance. Způsobem popsaným výše se vypočte rozdíl a stanoví průměr se směrodatnou odchylkou.

#### **4.3.5.2 Stanovení aktivity extraktů**

Při měření extraktů se postupuje stejně, ředění extraktů je však: 20 mg/ml, 2, 0,2, 0,02, 0,002 a DMSO.

#### **4.4 Stanovení antioxidační aktivity**

Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů vzhledem k předchozím výsledkům nebylo provedeno.

## **5 VÝSLEDKY A DISKUZE**

## 5.1 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Galanthus elwesii*

V sumárním alkaloidním extraktu, který byl získán z cibulí druhu *Galanthus elwesii* (**Obr. 17**), bylo pomocí GC/MS analýzy detekováno a následně identifikováno celkem 5 alkaloidů, jež jsou spolu s relativním procentuálním zastoupením shrnuty v následující tabulce (**Tab. 12**). Identifikované alkaloidy patří do následujících strukturních typů: lykorinový (**4**), tazettinový (**3**) a galanthaminový (**1, 2, 5**). Struktury alkaloidů jsou zobrazeny na **Obr. 18**. Jako hlavní látka byl identifikován alkaloid tazettinového typu – tazettin. Druhou nejvíce zastoupenou látkou byl galanthamin a v minoritním množství byly identifikovány alkaloidy inkartin, lykorin a narwedín. Inhibiční aktivita tohoto extraktu vůči HuAChE byla zajímavá –  $IC_{50} = 10,29 \pm 1,00 \mu\text{g/mL}$  a velmi pravděpodobně je spojena s přítomností galanthaminových alkaloidů. Inhibiční aktivita vůči HuBuChE byla  $IC_{50} = 51,60 \pm 6,16 \mu\text{g/mL}$ . Studie zabývající se výzkumem inhibice HuBuChE zatím neposkytly dostatek informací pro to, aby bylo možné formulovat závěry, které alkaloidy jsou za tuto aktivitu zodpovědné. V naší laboratoři bylo zatím izolováno a testováno cca 20 alkaloidů a zatím pouze galanthamin vykázal jistou inhibiční aktivitu vůči HuBuChE ( $IC_{50} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ )<sup>68</sup>. Izolace a testování dalších alkaloidů nadále probíhá.

Složení alkaloidního extraktu jednoho konkrétního rostlinného druhu se může značně lišit v závislosti na lokalitě sběru, charakteristice podnebí, typu rostlinné drogy a době uplynulé od jejího sběru. Z alkaloidního extraktu získaného z celých rostlin *Galanthus elwesii* byly již dříve získány i jiné alkaloidy, než jsou ty uvedené v tabulce (**Tab. 12**). Mezi ně patří například sanguinin, *N*-demethylgalanthamin, leukotamin (alkaloidy galanthaminového typu), 11-*O*-(3'-hydroxybutanoyl)hamayn, hamayn (alkaloidy haemanthaminového typu), 2-*O*-(3'-acetoxybutanoyl)lykorin, anhydrolykorin, 11, 12-dehydroanhydrolykorin, 2-*O*-(3'-hydroxybutanoyl)lykorin (alkaloidy lykorinového typu), 11-deoxytazettin, 6-*O*-methylpretazettin (alkaloidy tazettinového typu), homolykorin, hippeastrin, galwesin, *O*-demethylgalwesin, 16-hydroxygalwesin, 16-hydroxy-9-*O*-demethylgalwesin, galasin, 2-hydroxyhomolykorin (alkaloidy homolykorinového typu) a 8-*O*-demethylvaskonin (neurčený strukturní typ)<sup>54,80,81</sup>.

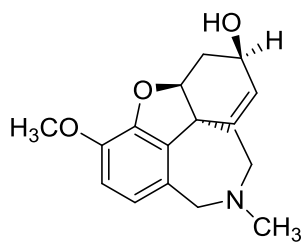
Právě zmíněný 2-*O*-(3'-hydroxybutanoyl)lykordin byl v *Galanthus elwesii* identifikován a jeho struktura byla určena pomocí NMR a dalších technik<sup>56</sup>.



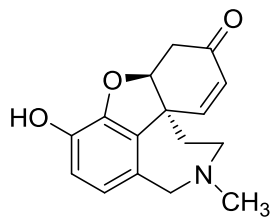
Obr. 17 *Galanthus elwesii*<sup>70</sup>

Tabulka 12 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Galanthus elwesii* a popis jejich hmotnostních spekter

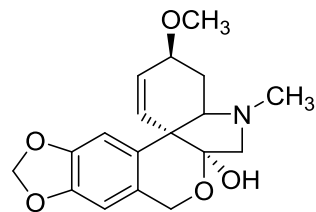
Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
1. Galanthamin	19,164	287(89), 286(100), 270(13), 244(26), 230(13), 216(32), 174(26), 128(9), 115(13)	30	NIST 11
2. Narwedín	20,330	285(85), 284(100), 242(20), 228(11), 216(20), 199(18), 174(29)	<1	NIST 11
3. Tazettin	22, 839	331(20), 316(20), 298 (25), 247(100), 230(10)	63	NIST 11
4. Lykordin	24,137	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	2	NIST 11
5. Inkartin	24,352	333(45), 332(100), 296(30), 259(70), 258(85), 250(30)	4	<sup>68</sup>



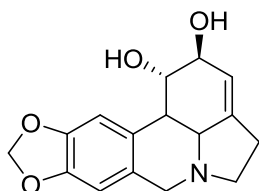
Galanthamin (1)



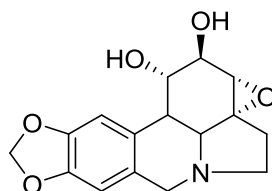
Narwedín (2)



Tazettín (3)



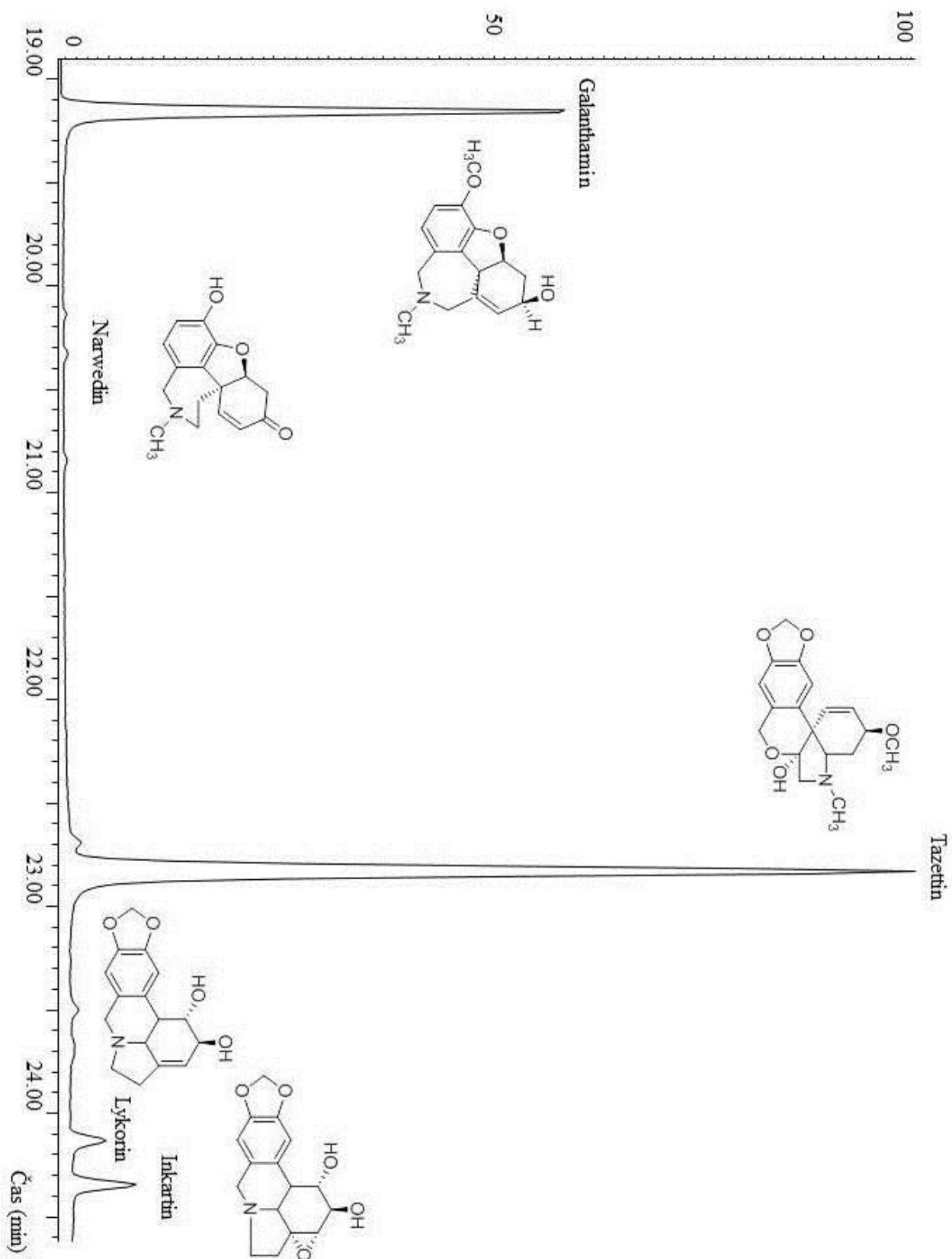
Lykorín (4)



Inkartín (5)

**Obr. 18** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Galanthus elwesii*





**Obř. 19** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Galanthus elwesii*

## 5.2 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Galanthus woronowii*

V sumárním alkaloidním extraktu izolovaného z cibulí druhu *Galanthus woronowii* bylo pomocí GC/MS analýzy detekováno 5 alkaloidů, z nichž 4 byly identifikovány. Jeden z detekovaných alkaloidů (**5**) se nám nepodařilo určit. Bohužel tento alkaloid byl v sumárním extraktu přítomen pouze ve stopovém množství (<1% TIC). Pro identifikaci této látky je nutná její izolace a strukturní studie za využití MS a NMR technik. Vzhledem k minimálnímu množství této látky v alkaloidním extraktu, se její získání v dostatečném množství jeví jako nesnadné. V naší laboratoři byl tentýž alkaloid detekován v sumárních alkaloidních extraktech v několika druzích a kultivarech rodu *Narcissus*. Ve větším relativním procentuálním zastoupení byl však identifikován pouze v druhu *Narcissus nanus*, ale i v tomto druhu to bylo pouze malé množství (2% TIC)<sup>24</sup>. Získaná inhibiční aktivita vůči HuAChE byla velmi dobrá –  $IC_{50} = 8,65 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$ , což bylo velmi pravděpodobně zapříčiněno vysokým zastoupením alkaloidů galanthaminového (**1**) a lykorinového (**3**, **4**) typu, s nimiž je inhibiční aktivita vůči HuAChE hlavně spojována a jejichž celkové relativní procentuální zastoupení bylo 98% TIC. Inhibiční aktivita vůči HuBuChE byla  $IC_{50} = 75,44 \pm 7,73 \mu\text{g/mL}$ . Rozdíl  $IC_{50}$  pro HuBuChE u tohoto druhu a dříve zmíněného druhu *Galanthus elwesii* může být mimo jiné dán i relativním procentuálním zastoupením galanthaminu, jež u *Galanthus elwesii* bylo 30% a u *Galanthus woronowii* bylo pouze 19%. Přesto právě cibule rostliny *Galanthus woronowii* sloužily jako zdroj pro izolaci galanthaminu pro terapeutické účely, než byly objeveny lepší zdroje pro jeho izolaci. Průmyslově se v současné době galanthamin izoluje z *Leucojum aestivum*<sup>5</sup>, různých kultivarů *Narcissus* a v Japonsku a Číně z *Lycoris radiata*<sup>23</sup>.

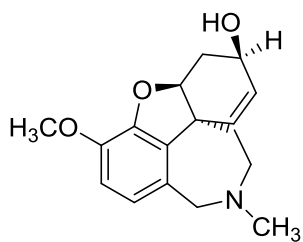
Z *Galanthus woronowii* (**Obr. 20**) byly již dříve v jiných studiích izolovány i další alkaloidy. Šlo mimo jiné o alkaloidy galanthaminového typu (narwedín, sanguinín), alkaloidy lykorinového typu 2-O-(3'-hydroxybutanoyl)lykorin<sup>82</sup> a sternbergine, který byl prvně identifikován v rodu *Galanthus* a dříve byl izolován hlavně z rodů *Sterbergia* a *Brunsvigia*<sup>83</sup>, tetrahydroisochinolinový alkaloid salsolin<sup>82</sup>, který byl vůbec poprvé identifikován v čeledi *Amaryllidaceae*.



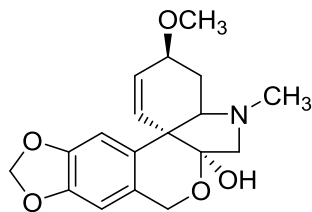
**Obr. 20** *Galanthus woronowii*<sup>84,85</sup>

**Tabulka 13** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Galanthus woronowii* a popis jejich hmotnostních spekter

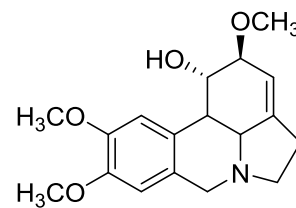
Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M+] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1. Galanthamin</b>	19,203	287(89), 286(100), 270(13), 244(26), 230(13), 216(32), 174(26), 128(9), 115(13)	19	NIST 11
<b>2. Tazettin</b>	22, 852	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	1	NIST 11
<b>3. Galanthin</b>	23,768	317(26), 316(18), 298(11), 284(14), 268(19), 266(15), 244(15), 243(93), 242(100), 228(9)	57	NIST 11
<b>4. Lykorin</b>	24,242	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	22	NIST 11
<b>5. A</b>	24,750	303(31), 302(22), 284(18), 266(17), 243(76), 242(100), 228(12), 162(12)	<1	



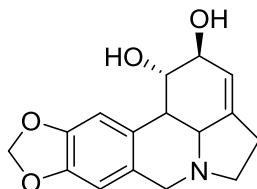
Galanthamin (1)



Tazettin (2)

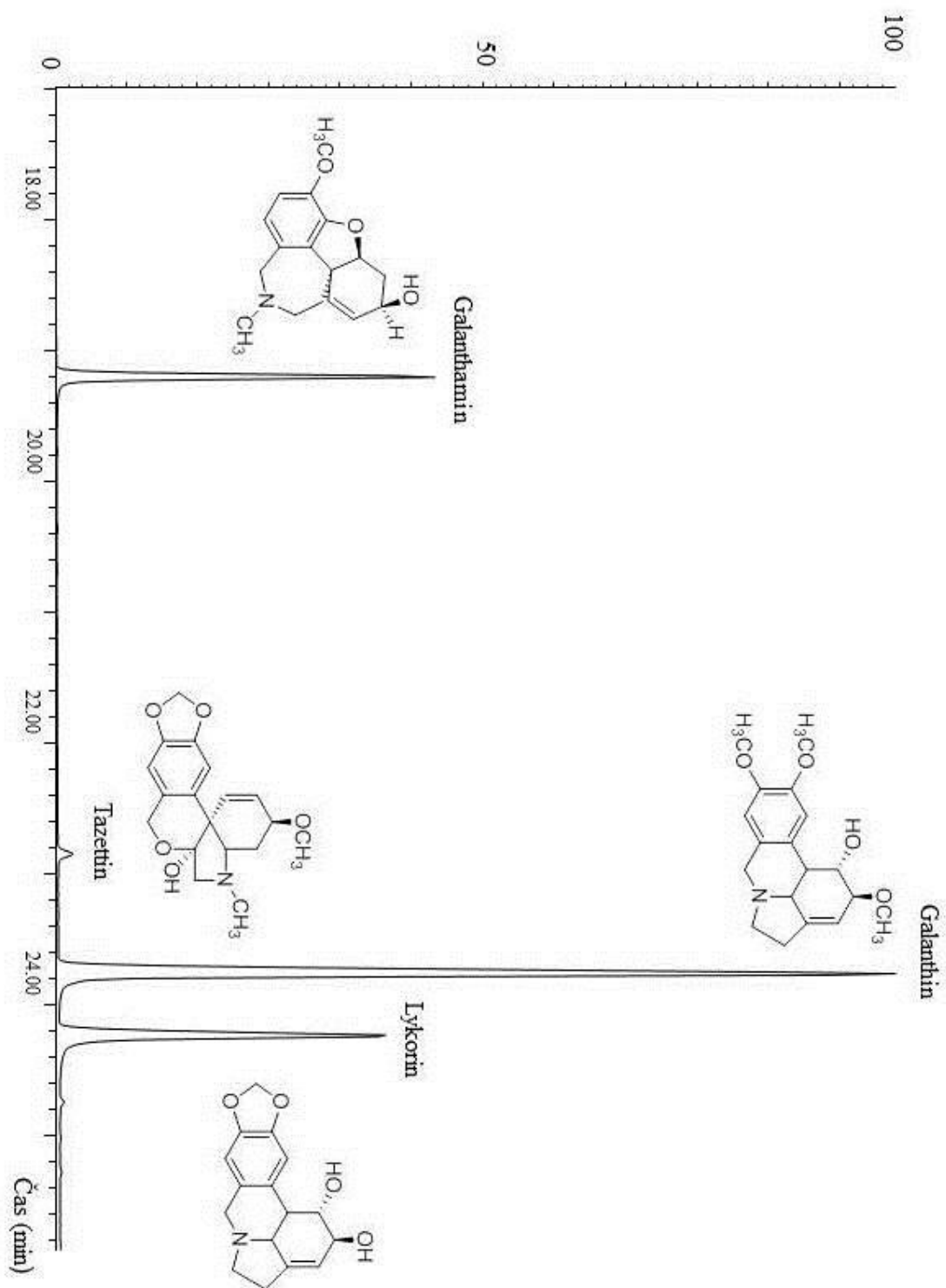


Galanthin (3)



Lykorin (4)

**Obr. 21** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Galanthus woronowii*



**Obr. 22** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Galanthus woronowii*

### 5.3 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT

V sumárním alkaloidním extraktu rostliny *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT bylo pomocí GC/MS detekováno celkem 14 alkaloidů, ale pouze 7 se podařilo identifikovat na základě jejich MS spekter pomocí komerční knihovny spekter, či dostupné literatury. Z osmi alkaloidů, které se nepodařilo identifikovat, se tři (**6**, **11**, **14**) vyskytovaly v extraktu v relativním procentuálním zastoupení  $\leq 1\%$  a jejich izolace v čistém stavu a následná identifikace bude náročná. Další z těchto alkaloidů (**9**, **10**, **12**, **13**) se vyskytují ve vyšším množství (3 – 7% TIC). Inhibiční aktivita alkaloidního extraktu tohoto kultivaru vůči HuAChE byla –  $IC_{50} = 38,37 \pm 5,51 \mu\text{g/mL}$ , ale v porovnání s předcházejícími rostlinnými druhy až 8x nižší. Opět je pravděpodobné, že tato aktivita je spojena s přítomností galanthaminu (**1**). Inhibiční aktivita tohoto alkaloidního extraktu vůči HuBuChE nízká ( $IC_{50} = 152,93 \pm 15,49 \mu\text{g/mL}$ ). Vzhledem k množství alkaloidů, které se nepodařilo identifikovat, se tato rostlina jeví jako vhodná pro podrobnou fytochemickou studii za účelem izolace nových, doposud nepopsaných struktur.



**Obr. 23** *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT<sup>47</sup>

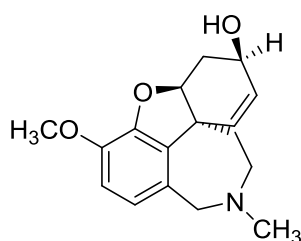
*Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT byla vyšlechtěna z *Leucojum aestivum* (tzv. letní bledule), která na rozdíl od *Leucojum vernalis* kvete až v období dubna a května. Kultivar byl vyšlechtěn především z dekorativních důvodů (**Obr. 23**).

Z *Leucojum aestivum* bylo doposud izolováno zatím asi 20 *Amaryllidaceae* alkaloidů. Mimo jiné byly izolovány 2 *N*-alkylované deriváty galanthaminu – *N*-allylnorgalanthamin ( $IC_{50, HuAChE} = 0,18 \mu M$ ) a *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin ( $IC_{50, HuAChE} = 0,16 \mu M$ ), jejichž inhibiční aktivita vůči HuAChE je lepší než aktivita samotného galanthaminu ( $IC_{50, HuAChE} = 1,82 \mu M$ ), což je velmi pravděpodobně způsobeno substitucí *N*-methylu za allylovou či 14-methylallylovou skupinu<sup>73</sup>. Limitujícím faktorem těchto látek je ale jejich nízká dostupnost z biologického materiálu. V rostlinách se vyskytují pouze v minoritních množstvích.

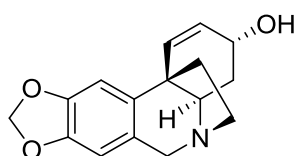
**Tabulka 14** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1. Galanthamin</b>	19,018	287(89), 286(100), 270(13), 244(26), 230(13), 216(32), 174(26), 128(9), 115(13)	8	NIST 11
<b>2. Krinin</b>	20,006	271(100), 270(14), 254(8), 242(8), 228(25), 216(14), 199(65), 187(57), 173(18), 115(22)	<1	NIST 11
<b>3. <i>O</i>-Acetylgalanthamin</b>	21,223	329(28), 328(35), 286(6), 270(100), 226(11), 216(31), 174(13), 115(17), 43(20)	<1	NIST 11
<b>4. 11, 12– Didehydroanhydrolykorin</b>	22,031	249(59), 248(100), 190(25), 163(7), 95(15)	<1	<sup>68</sup>
<b>5. Tazettin</b>	22,679	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	13	NIST 11
<b>6. A1</b>	23,365	371(82), 338(26), 257(86), 240(39), 225(73), 131(100), 116(35)	<1	
<b>7. 1-<i>O</i>-Acetyldihydrolykorin</b>	23,613	331(32), 270(27), 252(14), 242(11), 229(64), 228(100), 210(5), 43(15)	5	NIST 11
<b>8. Lykorin</b>	24,034	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	54	NIST 11
<b>9. A2</b>	24,161	299(21), 266(6), 250(36), 225(65),	3	

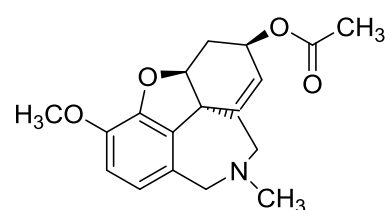
		224(100), 212(11)	
<b>10. A3</b>	25,930	279(72), 278(100), 263(9), 235(13), 178(10)	4
<b>11. A4</b>	26, 114	?317(13), 316(26), 299(57), 268(100), 250(40), 242(55), 225(26), 214(65), 212(68)	1
<b>12. A5</b>	26,220	373(19), 372(19), 271(21), 270(100), 216(20), 165(10)	7
<b>13. A6</b>	26,379	299(45), 278(14), 268(100), 264(99), 250(51), 212(29), 178(13), 147(17)	3
<b>14. A7</b>	28,170	?295(95), 294(100), 279(61), 250(10), 222(7), 194(7), 164(8), 140(21), 96(25)	<1



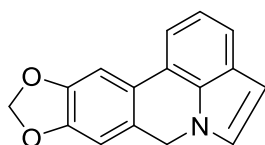
Galanthamin (1)



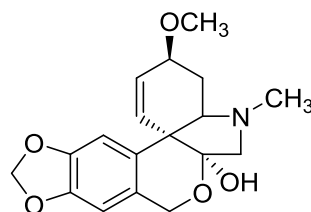
Krinin (2)



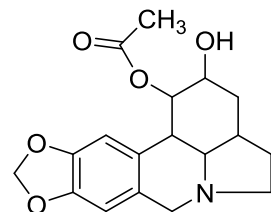
O-Acetylgalanthamin (3)



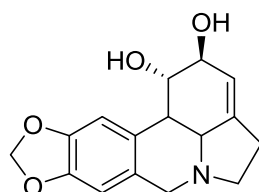
11, 12-Didehydroanhydrolykorin (4)



Tazettin (5)



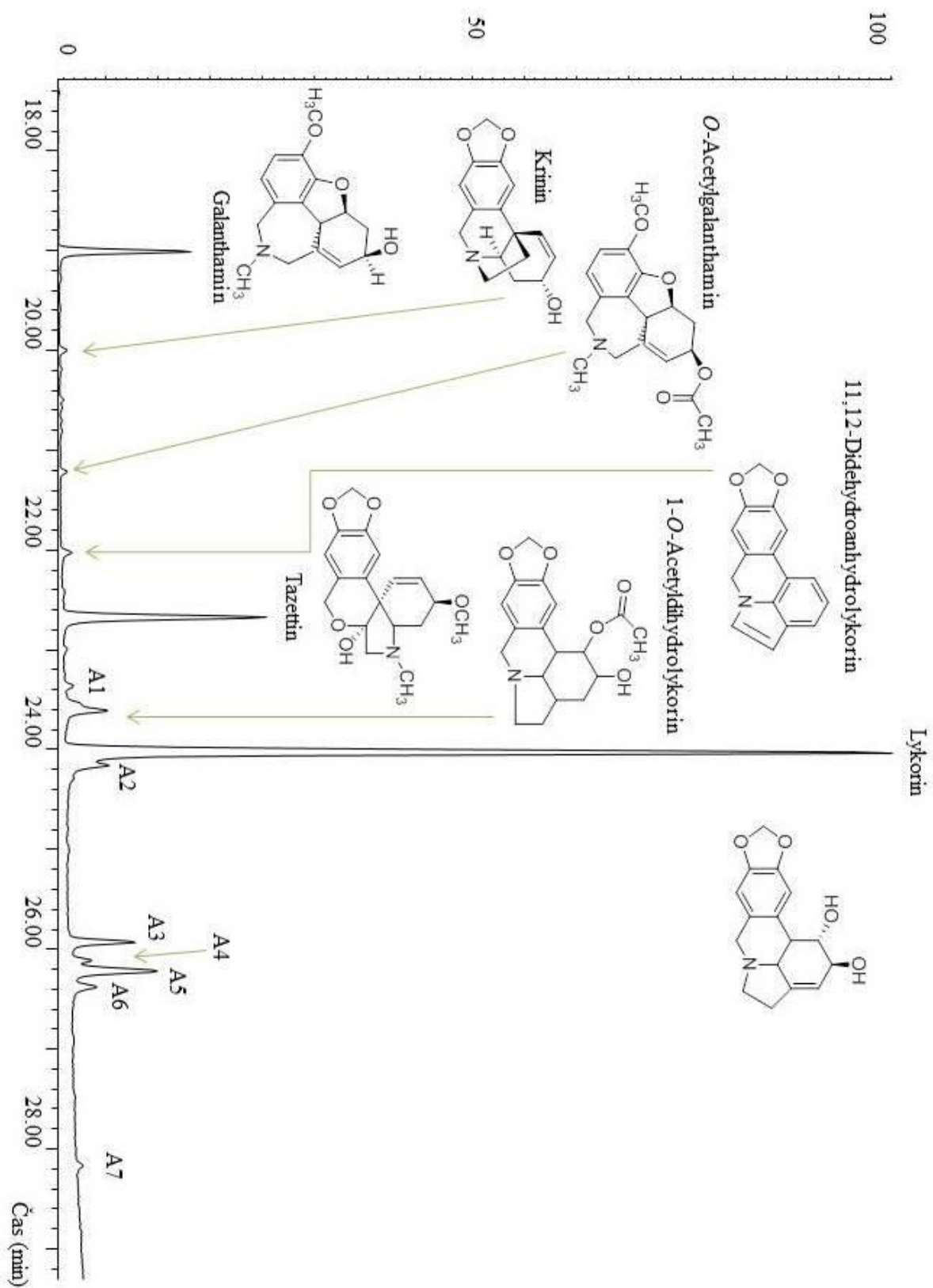
1-O-Acetyldihydrolykorin (7)



Lykorin (8)

**Obr. 24** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT





**Obr. 25** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT

## 5.4 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Leucojum vernum*

V sumárním alkaloidním extraktu získaného z cibulí druhu *Leucojum vernum* byly detekovány a následně identifikovány 3 alkaloidy. I když v tomto sumárním extraktu nebyl identifikován galanthamin a zastoupení alkaloidů galanthaminového typu (**1**) bylo <1%, byla  $IC_{50} = 36,30 \pm 4,80 \mu\text{g/mL}$ . Tato hodnota inhibiční aktivity vůči HuAChE je relativně dobrá i přesto, že lykorin a homolykorin (**2**, **3**) HuAChE nijak neinhibují. Inhibice HuBuChE měla hodnotu  $IC_{50} = 49,93 \pm 7,14 \mu\text{g/mL}$ , což by přibližně odpovídalo inhibiční aktivitě galanthaminu ( $IC_{50} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ )<sup>24</sup>. Tento sumární extrakt ale galanthamin neobsahuje, proto by bylo potřeba izolovat identifikované alkaloidy v čisté formě a změřit jejich HuBuChE inhibiční aktivitu, abychom zjistili, který z nich je za tuto inhibici zodpovědný a potenciálně dále využitelný.



**Obr. 26** *Leucojum vernum*<sup>87</sup>

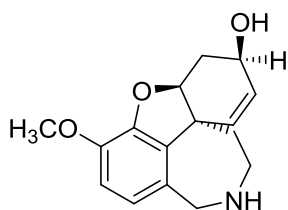
Výskyt a množství jednotlivých alkaloidů se u stejné rostliny může lišit v závislosti na lokalitě výskytu, povětrnostních podmínkách a dostupnosti jednotlivých nutrientů. V dřívějších pracích byl z cibulí *Leucojum vernum* izolován například 2-*O*-acetyllykorin (lykorinový typ)<sup>3</sup>, 9-*O*-demethylhomolykorin, 5 $\alpha$ -hydroxyhomolykorin, hippeastrin (alkaloidy homolykorinového typu), 11-hydroxyvittatin (haemanthaminový

typ) a také leukovernin a acetylleukovernin – alkaloidy galanthaminového typu, které byly poprvé izolovány z *Leucojum vernum* (**Obr. 26**) a následně strukturně popsány pomocí NMR a dalších metod<sup>86</sup>.

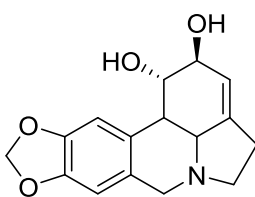
*Leucojum vernum* je menší než dříve zmíněná *Leucojum aestivum* – dorůstá se zhruba 10 - 40 cm. Květy bývají jednotlivé, výjimečně stvol nese květy 2 – 3. Plodem je široce elipsoidní tobolka obsahující semena s elaiosomem<sup>36</sup>.

**Tabulka 15** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Leucojum vernum* a popis jejich hmotnostních spekter

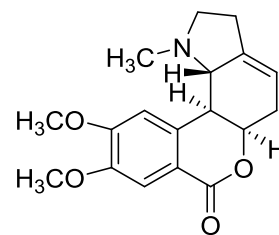
Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1. N-Demethylgalanthamin</b>	19,725	273(95), 272(100), 230(32), 202(27), 174(15), 128(11), 115(13), 77(10)	<1	NIST 11
<b>2. Lykorin</b>	24,212	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	61	NIST 11
<b>3. Homolykorin</b>	24, 458	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	38	<sup>24</sup>



N-Demethylgalanthamin (**1**)

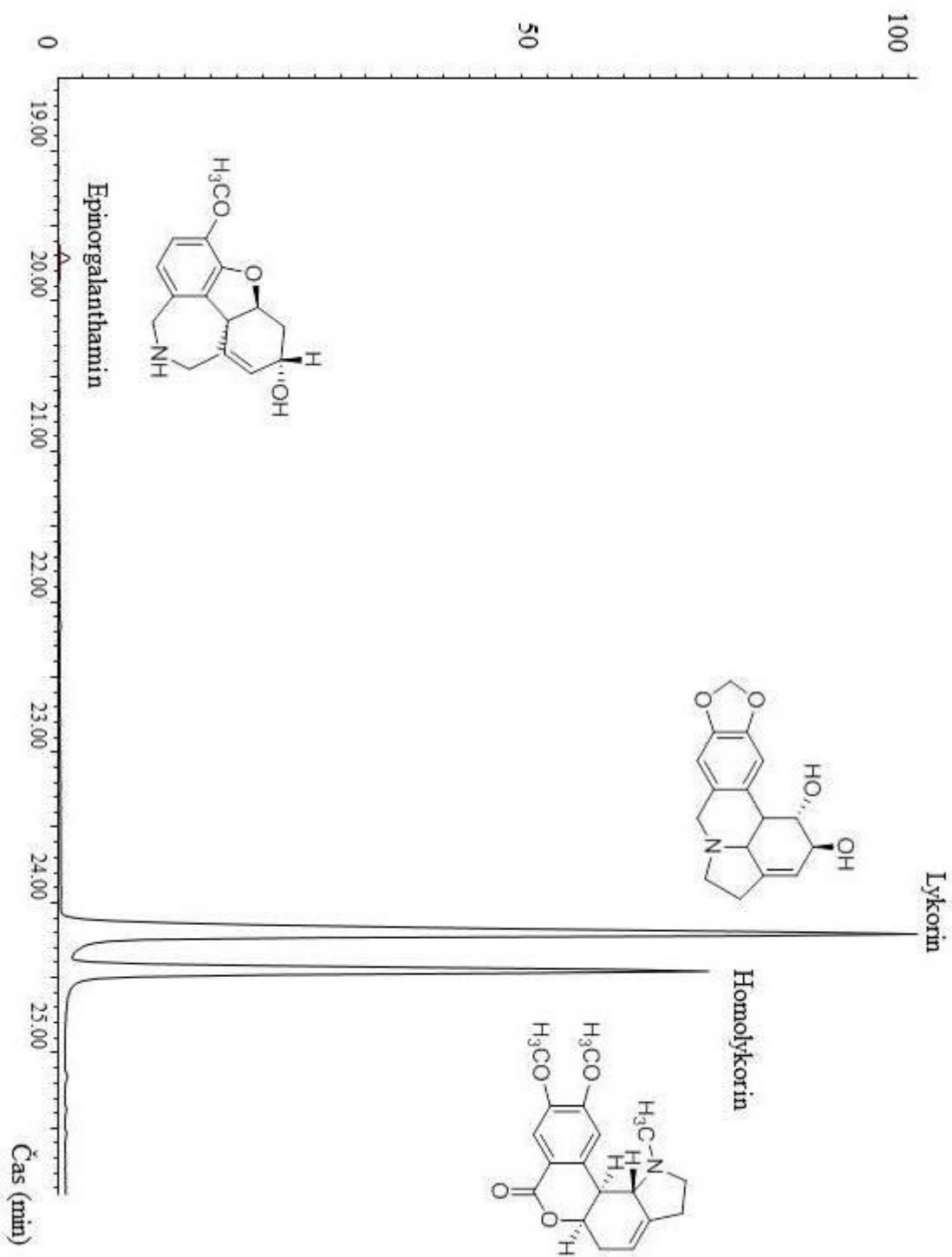


Lykorin (**2**)



Homolykorin (**3**)

**Obr. 27** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Leucojum vernum*



**Obr. 28** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Leucojum vernum*

## 5.5 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN

Za využití GC/MS bylo v alkaloidním extraktu *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN detekováno 12 alkaloidů, z nichž 2 se nepodařilo identifikovat. Identifikované alkaloidy patří do několika strukturních typů – galanthaminového (1), lykorinového (3, 4, 5, 8, 9), haemanthaminového (6), krininového (7) a homolykorinového (10, 12). Inhibiční aktivita tohoto extraktu vůči HuAChE byla velmi nízká ( $IC_{50} = 476,48 \pm 60,20 \mu\text{g/mL}$ ). Tato vysoká hodnota  $IC_{50}$  souvisí se skutečností, že při GC/MS analýze nebyly identifikovány látky, které disponují aktivitou vůči HuAChE. Naproti tomu byla inhibiční aktivita vůči HuBuChE relativně dobrá -  $IC_{50} = 49,99 \pm 5,38 \mu\text{g/mL}$ . V alkaloidním profilu byly určeny alkaloidy, které doposud nebyly sledovány z hlediska inhibice HuBuChE (3, 4, 5, 7, 9, 10). Z tohoto důvodu se tato rostlina jeví jako zajímavá za účelem izolace těchto látek a jejich biologického testování.

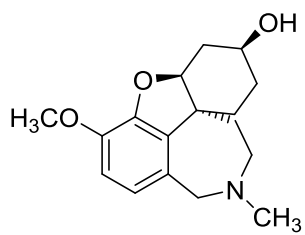


**Obr. 29** *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN<sup>89</sup>

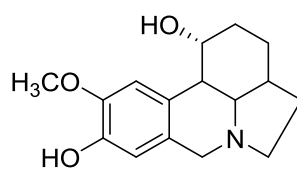
*Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN je botanický kultivar vyšlechtěný primárně pro okrasné účely. Patří do skupiny narcisů s velkou pakorunkou – narcisy v této skupině nesou na stonku pouze jeden květ, v němž pakorunka přesahuje třetinu délky okvětních lístků (**Obr. 29**) a patří do podskupiny s bílými okvětními lístky a barevnou pakorunkou<sup>47,88</sup>.

**Tabulka 16** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN a popis jejich hmotnostních spekter

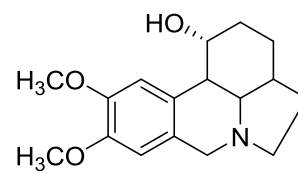
Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1. Lykoramin</b>	19,314	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	tr	NIST 11
<b>2. A8</b>	20,625	?177(7), 109(100)	1	
<b>3. Norpluviin</b>	21,299	273(75), 273(33), 254(42), 242(6), 229(50), 228(100), 241(5)	3	NIST 11
<b>4. Pluviin</b>	21,569	287(81), 286(48), 268(52), 254(15), 243(66), 242(100), 228(23)	1	NIST 11
<b>5. 11, 12– Didehydroanhydrolykorin</b>	22,076	249(59), 248(100), 190(25), 163(7), 95(15)	1	<sup>68</sup>
<b>6. Haemanthamin</b>	22,486	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	16	NIST 11
<b>7. Pankracin</b>	23,216	287(100), 286(20), 270(17), 243(17), 223(15), 214(16), 199(18), 185(26)	11	NIST 11
<b>8. Lykorin</b>	24,046	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	10	NIST 11
<b>9. 9–O-Methylpseudolykorin</b>	24,604	303(35), 284(24), 243(86), 242(100)	<1	NIST 11
<b>10. Homolykorin</b>	25,086	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	39	<sup>24</sup>
<b>11. A9</b>	25,450	329(31), 269(76), 268(100), 250(93), 240(16), 226(81), 211(12), 147(15)	2	
<b>12. Hippeastrin</b>	26,033	315(-), 162(4), 134(4), 125(100), 96(36), 82(3)	15	<sup>68</sup>



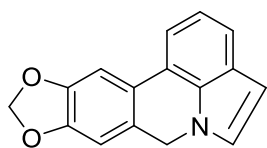
Lykoramin (1)



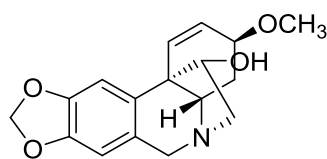
Norpluviin (3)



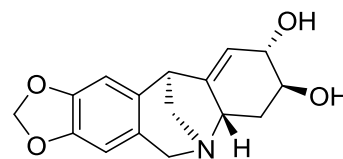
Pluviin (4)



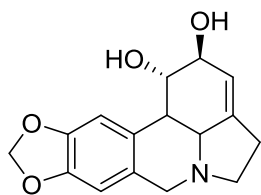
11, 12-Didehydroanhydrolykorin (5)



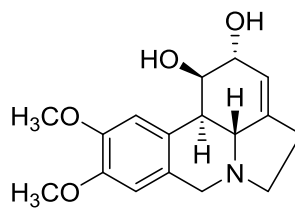
Haemanthamin (6)



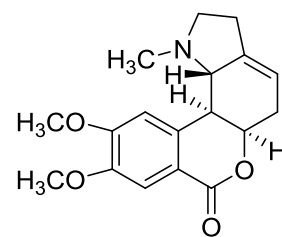
Pankracin (7)



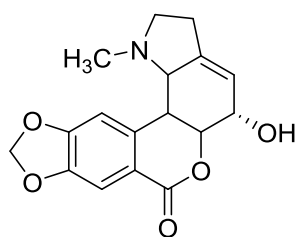
Lykorin (8)



9-O-Methylpseudolykorin (9)



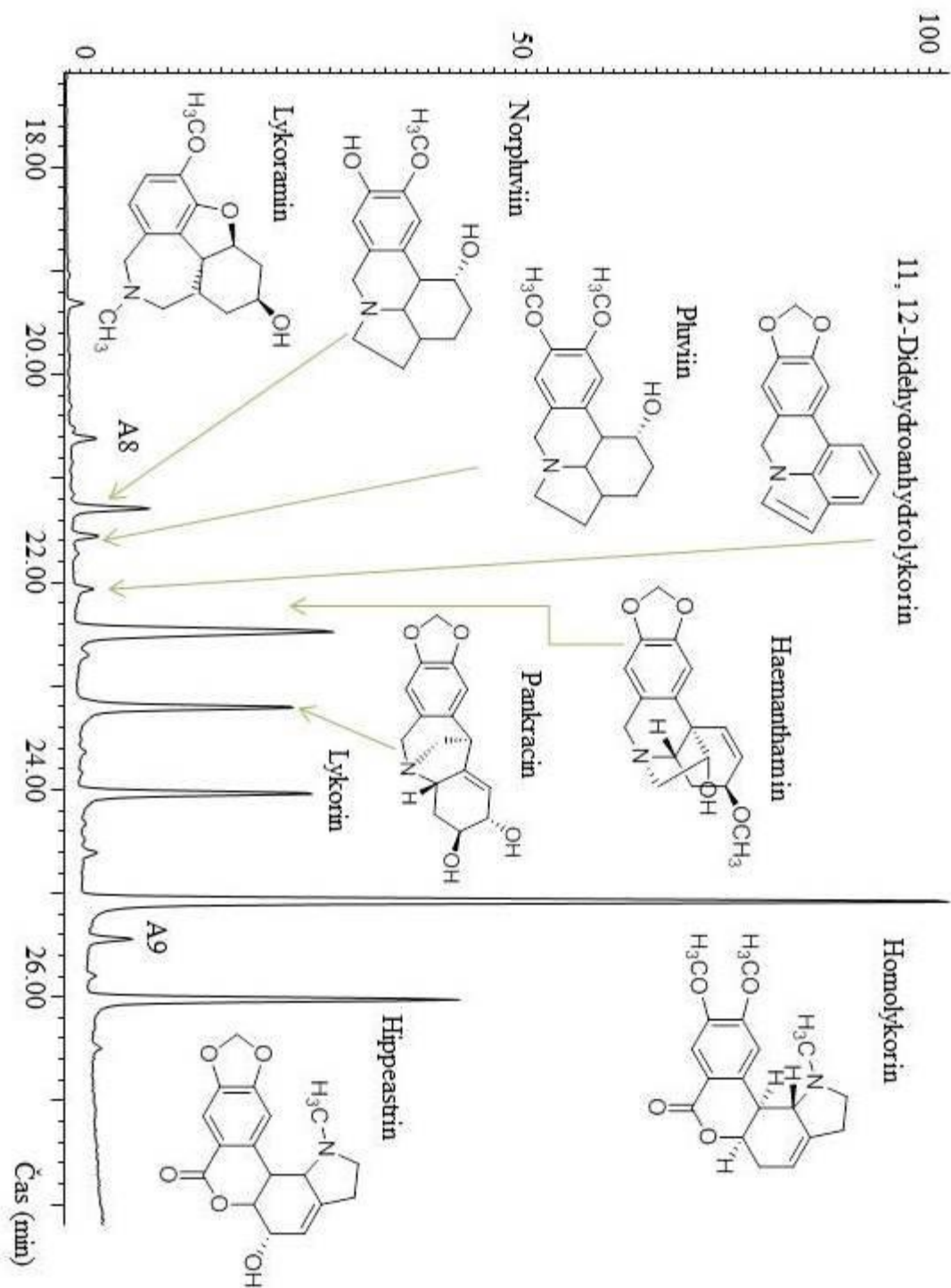
Homolykorin (10)



Hippeastrin (12)

**Obr. 30** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN





**Obr. 31** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN



## 5.6 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. QUIRINUS

V sumárním alkaloidním extraktu *Narcissus* cv. QUIRINUS bylo detekováno dohromady 10 alkaloidů, z nichž se 8 podařilo identifikovat. Oba neurčené alkaloidy (**6**, **11**) se v extraktu vyskytovaly v relativním procentuálním zastoupení  $\leq 1\%$ , takže jejich izolace v čisté formě se jeví jako obtížná. Hodnota  $IC_{50}$  byla  $17,72 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$ , což značí relativně dobrou inhibiční aktivitu vůči HuAChE. Tato aktivita je pravděpodobně způsobena zastoupením inhibujících alkaloidů galanthaminového typu (**2**, **4**) a přítomností 11, 12-didehydroanhydrolykorinu (**7**). Aktivita inhibice HuBuChE ( $IC_{50} = 46,61 \pm 4,20 \mu\text{g/mL}$ ) je o něco lepší než u *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, což mohlo být způsobeno přítomností galanthaminu v tomto alkaloidním extraktu.

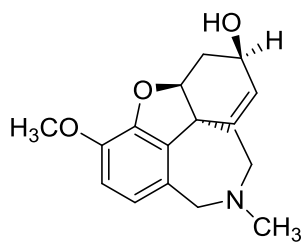
*Narcissus* cv. QUIRINUS byl vyšlechtěn primárně k okrasným účelům. Stejně jako *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN patří do skupiny narcisů s velkou pakorunkou - ovšem do podskupiny, která má barevnou nejen pakorunku, ale i okvětní lístky<sup>88,90</sup> – viz **Obr. 32**.



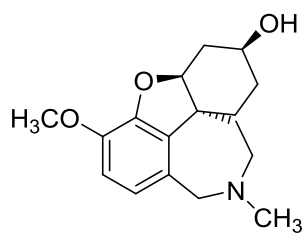
**Obr. 32** *Narcissus* cv. QUIRINUS<sup>91</sup>

**Tabulka 17** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Narcissus* cv. QUIRINUS a popis jejich hmotnostních spekter

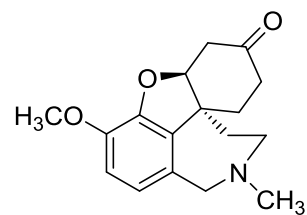
Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1. Galanthamin</b>	19,071	287(89), 286(100), 270(13), 244(26), 230(13), 216(32), 174(26), 128(9), 115(13)	9	NIST 11
<b>2. Lykoramin</b>	19,336	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	2	NIST 11
<b>3. nečistota</b>	19,600		<1	
<b>4. Lykoraminon</b>	19,666	287(70), 286(100), 272(5), 258(8), 244(8), 230(12), 218(20), 202(25)	1	<sup>68</sup>
<b>5. Krinin</b>	20,061	271(100), 270(14), 254(8), 242(8), 228(25), 216(14), 199(65), 187(57), 173(18), 115(22)	<1	NIST 11
<b>6. A10</b>	20,580	?315(48), 314(65), 272(7), 254(100), 242(22), 228(29)	1	
<b>7. 11, 12- Didehydroanhydrolykorin</b>	22,076	249(59), 248(100), 190(25), 163(7), 95(15)	<1	<sup>68</sup>
<b>8. Haemanthamin</b>	22,485	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	<1	NIST 11
<b>9. Tazettin</b>	22,732	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	10	NIST 11
<b>10. Lykorin</b>	24,133	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	74	NIST 11
<b>11. A11</b>	30,218	341(100), 324(8), 297(5), 266(10), 236(17), 208(44), 162(10)	<1	



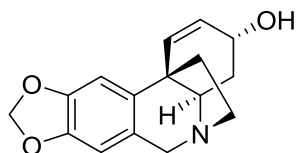
Galanthamin (1)



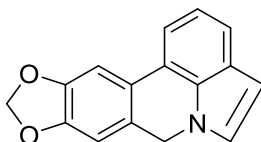
Lykoramin (2)



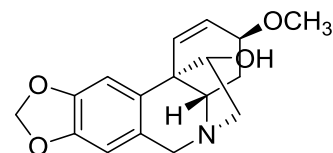
Lykoraminon (4)



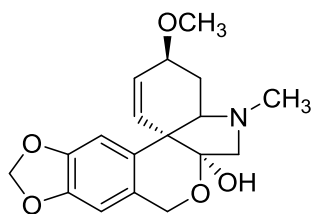
Krinin (5)



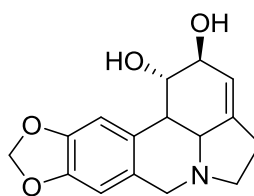
11, 12-Didehydroanhydrolykorin (7)



Haemanthamin (8)

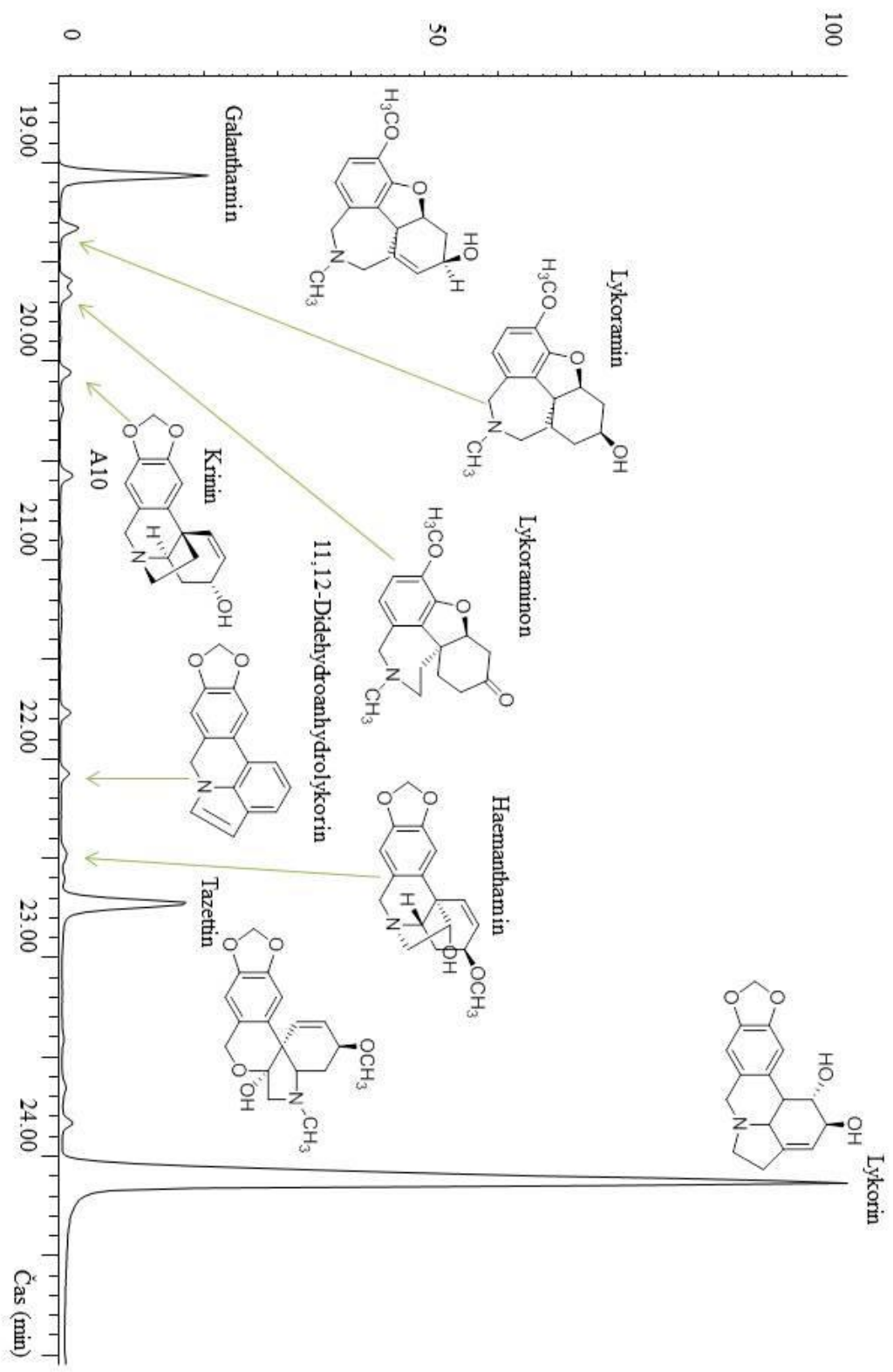


Tazettin (9)



Lykorin (10)

**Obr. 33** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Narcissus* cv. QUIRINUS



**Obr. 34** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. QUIRINUS

## 5.7 GC/MS analýza a biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE

V sumárním alkaloidním extraktu izolovaného z kultivaru *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE bylo pomocí GC/MS analýzy detekováno a následně i identifikováno celkem 12 různých alkaloidů. Za pomoci výše zmíněné Ellmanovy metody byly změřeny inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE. Obě tyto hodnoty jsou zajímavé - HuAChE  $IC_{50} = 10,72 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$ , což je velmi pravděpodobně dáno vysokým zastoupením inhibujících alkaloidů galanthaminového (**1**, **3**, **4**) a lykorinového (**7**, **10**, **11**) strukturního typu. I HuBuChE inhibiční aktivita byla velmi dobrá -  $IC_{50} = 29,62 \pm 3,47 \mu\text{g/mL}$ . Tato hodnota je mnohem nižší než u čistého galanthaminu ( $IC_{50} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ )<sup>24</sup>. Tato skutečnost činí *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE zajímavým pro izolaci čistých látek a jejich biologické testování, což je předmětem dalšího výzkumu na naší katedře.

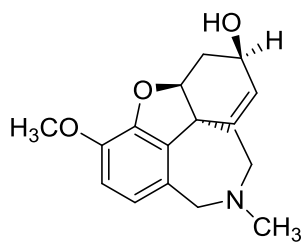
Kultivar *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE byl vyšlechtěn hlavně za dekorativním účelem. Patří do stejné skupiny narcisů jako oba předchozí kultivary, a tedy do skupiny s velkou pakorunkou, a do stejné podskupiny jako *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN – tj. s bílými okvětními lístky a barevnou korunkou (**Obr. 35**).



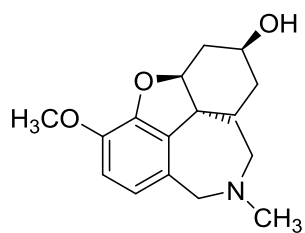
**Obr. 35** *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE<sup>92,93</sup>

**Tabulka 18** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE a popis jejich hmotnostních spekter

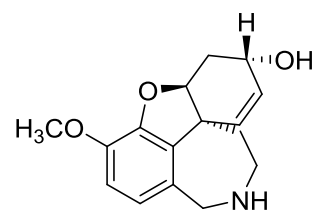
Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1. Galanthamin</b>	19,065	287(89), 286(100), 270(13), 244(26), 230(13), 216(32), 174(26), 128(9), 115(13)	19	NIST 11
<b>2. Lykoramin</b>	19,330	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	3	NIST 11
<b>3. Epinorgalanthamin</b>	19,640	273(95), 272(100), 230(32), 202(27), 174(15), 128(11), 115(13), 77(10)	3	NIST 11
<b>4. N-Demethyllykoramin</b>	19,878	275(75), 274(100), 202(11), 188(18), 175(15), 159(12), 115(20)	1	<sup>68</sup>
<b>5. Narwedín</b>	20,231	285(85), 284(100), 242(20), 228(11), 216(20), 199(18), 174(29)	tr	NIST 11
<b>6. Karanin</b>	20,850	271(86), 270(46), 252(52), 250(10), 240(12), 227(48), 226(100), 215(5)	9	<sup>68</sup>
<b>7. 11, 12- Didehydroanhydrolykorin</b>	22,076	249(59), 248(100), 190(25), 163(7), 95(15)	1	<sup>68</sup>
<b>8. Haemanthamin</b>	22,482	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	6	NIST 11
<b>9. Lykorin</b>	24,083	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	54	NIST 11
<b>10. 9-O-Methylpseudolykorin</b>	24,614	303(35), 284(24), 243(86), 242(100)	2	NIST 11
<b>11. Pseudolykorin</b>	25,121	289(32), 288(21), 270(21), 252(14), 229(73), 228(100), 214(7), 147(7), 119(12), 44(11)	<1	NIST 11
<b>12. Hippeastrin</b>	26,021	315(-), 162(4), 134(4), 125(100), 96(36), 82(3)	<1	<sup>68</sup>



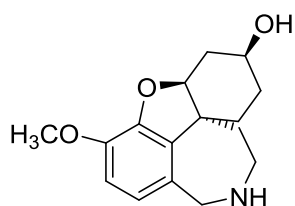
Galanthamin (1)



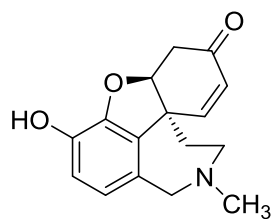
Lykoramin (2)



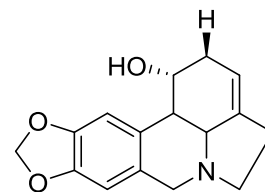
Epinorgalanthamin (3)



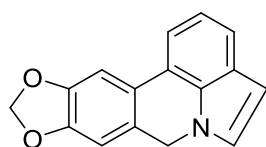
Demethyllykoramin (4)



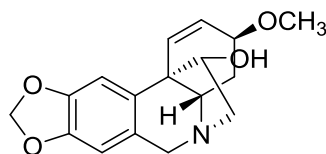
Narwedín (5)



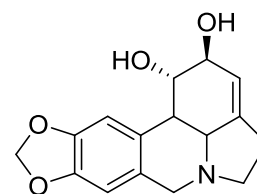
Karanin (6)



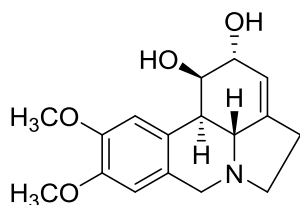
11,12-Didehydroanhydrolykorin (7)



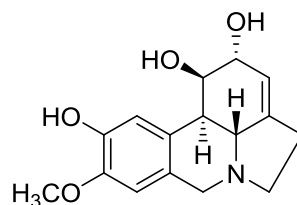
Haemanthamin (8)



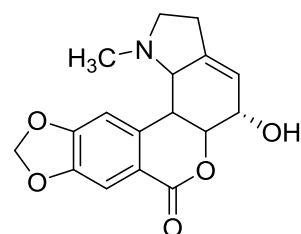
Lykorin (9)



9-O-Methylpseudolykorin (10)

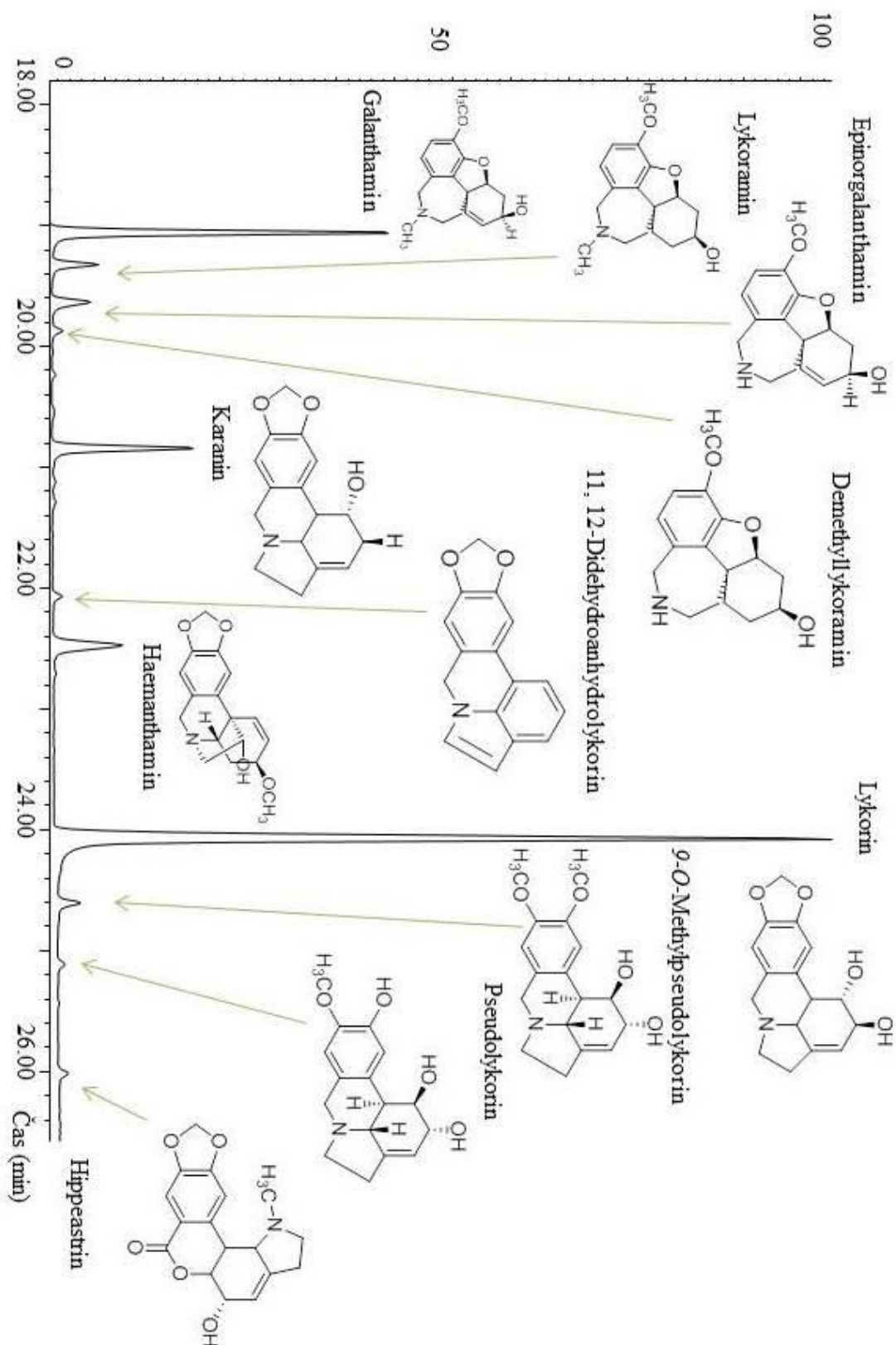


Pseudolykorin (11)



Hippeastrin (12)

**Obr. 36** Struktury alkaloidů identifikovaných v *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE



**Obr. 37** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE



## **6 ZÁVĚR**

V rámci této diplomové práce bylo připraveno sedm sumárních alkaloidních extraktů z různých druhů a kultivarů rodů *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus* náležících do čeledi *Amaryllidaceae*. Tyto sumární extrakty byly podrobeny GC/MS analýze a spektrofotometrickému stanovení inhibiční aktivity vůči HuAChE a HuBuChE pomocí Ellmanovy metody. Antioxidační aktivita jednotlivých sumárních extraktů pomocí DPPH testu nakonec nebyla stanovována, neboť se tento test u sumárních extraktů projevil jako neprůkazný.

Za využití GC/MS techniky byly identifikovány jednotlivé alkaloidy. Byly určeny látky různých strukturních typů. Bohužel, ne u všech látek se nám podařilo určit jejich strukturu. Může se jednat o látky, jejichž hmotnostní spektra nejsou dostupná v literatuře, komerčních knihovných spekter (v našem případě NIST 11), nebo o látky, které ještě nebyly identifikovány a strukturně určeny. Nejvíce neidentifikovaných látek se nacházelo v sumárním alkaloidním extraktu *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT. Tento kultivar by tedy mohl být zajímavý z hlediska výzkumu zaměřeného na izolaci dosud neidentifikovaných látek v čistém stavu, určení jejich struktury a testování biologických aktivit těchto látek.

Z testovaných rostlin vykázal nejlepší inhibiční aktivitu vůči HuAChE alkaloidní extrakt *Galanthus woronowii* ( $IC_{50} = 8,65 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$ ). Tato aktivita byla pravděpodobně způsobena relativně vysokým obsahem galanthaminu. Zajímavou aktivitu v inhibici HuAChE vedle *Galanthus woronowii*, vykazaly ještě sumární alkaloidní extrakty získané z cibulí *Galanthus elwesii* ( $IC_{50} = 10,29 \pm 1,00 \mu\text{g/MI}$ ) a *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE ( $IC_{50} = 10,72 \pm 0,83 \mu\text{g/MI}$ ). Poslední zmíněný sumární extrakt získaný z cibulí *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE byl také nejaktivnějším vůči HuBuChE ( $IC_{50} = 29,62 \pm 3,47 \mu\text{g/MI}$ ). Tento sumární extrakt obsahuje celou řadu látek, jejichž schopnost inhibovat HuBuChE zatím nebyla v čistém stavu testována. Z tohoto hlediska by bylo zajímavé jednotlivé alkaloidy z tohoto extraktu izolovat a testovat, aby bylo zjištěno, která či které z látek jsou za tuto inhibiční aktivitu zodpovědné. Vzhledem k inhibici HuAChE i HuBuChE by bylo zajímavé zjistit, zda by některý z alkaloidů nebyl duálním inhibitorem obou těchto enzymů, neboť tato spojená aktivita by byla v terapii AD velmi žádaná.

Antioxidační aktivita alkaloidních extraktů nebyla nakonec testována, a to z důvodu neaktivity extraktů s velmi podobných alkaloidním profilem.

## **7 LITERATURA**

1. Suchý V. (1994) *Farmakognosie: Část všeobecná*. Univerzita Komenského, Bratislava, 1 – 213.
2. Berkov S, Codina C, Bastida J. (2012) The Genus *Galanthus*: A Source of Bioactive Compounds. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech, , 235 - 254. Dostupné 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>
3. Szilávik L, Gyuris Á, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J. (2004) Alkaloids from *Leucojum vernum* and Antiretroviral Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 871-873
4. Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. (2013) Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, **107**, 701 - 708.
5. Harvey A L. (1995) The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogues. *Pharmacology & Therapeutics*, **68**, 113 - 128.
6. Jiráček R. (2004) Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie*, **18**, 212 - 214.
7. Jiráček R. (2011) Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR. *Neurologie pro praxi*, **12**, 135 - 137.
8. Pydychová E. (2002) Alzheimerova nemoc. In: *SOLUTIO* [online]. Medon [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: <http://www.medon-solutio.cz/>
9. Rössner P. (2004) Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, **5**, 11 - 16.
10. Seven Stages of Alzheimer's. In: *Alzheimer's association* [online]. [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_stages\\_of\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp)

11. O'Brien R J, Wong P C. (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience*, **34**, 185 - 204. MS dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21456963>
12. APP. In: [online]. [cit. 2015-03-18].  
Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APP>
13. Vališ M, Kalnická D. (2011) Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi*, **12**, 33 - 35.
14. Lansdall C J. (2014) An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. *Bioscience Horizons*, **7**.
15. Robbins T W, McAlonan G, Muir G L, Everitt B J, Gründer G. (1997) Cognitive enhancers in theory and practice: studies of the cholinergic hypothesis of cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, **83**, 773-784.
16. Jiráček R. (2009) Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí. *Neurologie pro praxi*, **10**, 384 - 389.
17. Petrovič M, Sedláček M, Horák M, Vyklický L. (2004) Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klinická farmakologie a farmacie*, **18**, 81 - 89.
18. Langmeier M et al. (2009) *Základy lékařské fyziologie*. Grada, Praha , 1 - 320.
19. DONEPEZIL SANDOZ 10 MG POTAHOVANÉ TABLETY.  
In: *SÚKL* [online]. 2010 [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0124877&tab=prices>
20. Slíva J, Jiráček R. (2004) Donepezilum. In: *Remedia* [online]. [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Donepezilum/6-I-cV.magarticle.aspx>

21. Vnoučková K, Jiráček R. (2003) Rivastigminum. In: *Remedia* [online]. [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.remmedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Rivastigminum/6-I-dW.magarticle.aspx>
22. Marco L, do Carmo Carreiras M. (2006) Galanthamine, a Natural Product for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **1**, 105 - 111.
23. Berkov S, Georgieva L, Kondakova V, Atanassov A, Viladomat F, Bastida J Codina C. (2009) Plant Sources of Galanthamine: Phytochemical and Biotechnological Aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **23**, 1170 - 1176.
24. Cahlíková L, Ločárek M, Benešová N, Kučera R, Chlebek J, Novák Z, Opletal L. (2013) Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Narcissus* Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. *Natural Product Communications*, **8**, 781 - 785.
25. Krejčová G, Ševelová L. (2003) Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy*, **72**, 37 - 44.
26. Pidrman V, Látalová K, Chroust K. (2006) Účinnost a snášenlivost galantaminu v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, **7**, 276 - 281.
27. EBIXA 10 MG. In: *SÚKL* [online]. 2010 [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0026502&tab=prices>
28. Martin J, Kršková Z, Dušek J. (2011) Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, **7**, 39 - 41.
29. Drtinová L, Pohanka M. (2013) Možnosti využití Huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chemické listy*, **107**, 12 - 15.
30. Evodiamin a rutecarpin, alkaloidy z plodů rostliny *Evodia rutaecarpa*. In: PATOČKA, Jiří. *Toxicology* [online]. 2011 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=437>

31. Šafratová M, Novák Z, Kulhánková A, Kuneš J, Hrabínová M, Jun D, Macáková K, Opletal L, Cahlíková L. (2013) Revised NMR data for 9-O-demethylgalanthine: an Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its Biological Activity. *Natural Product Communications*, **8**, 1 - 2.
32. Jahodář L. (2009) *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha, 1 – 264.
33. Bal G, Van der Veken P, Antonov D, Lambeir A-M, Grellier P, Croft S L, Augustyns K, Haemers A. (2003) Prolylisoxazoles: potent inhibitors of prolyl oligopeptidase with antitrypanosomal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 2875-2878.
34. STEVENS, Peter. *Angiosperm Phylogeny Website* [online]. 2013 [cit. 2015-03-21].  
Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>
35. Čeled' Amaryllidaceae - amarylkovité. In: *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2015-03-21]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/seznamp.php?C4>
36. Štěpánková J et al (Eds.). (2010) *Květena České republiky 8*. Academia, Praha, 1 - 712.
37. Elgorashi E E, Stafford G I, van Staden J. (2004) Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 260-262.
38. Takos A, Rook F. (2013) Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 11713 - 11741.
39. Hrdina V, Hrdina R, Jahodář L, Martinec Z, Merka V. (2004) *Přírodní toxiny a jedy*. Galén, Praha, 1 - 302.
40. Ivanov I, Georgiev V, Pavlov A. (2013) Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *Journal of Plant Physiology*, **170**, 1122-1129.
41. Davis A P. (1999) *The genus Galanthus*. Timber Press, Portland, 1 - 297.



42. Kovář P. (2012) Co a jak sdílejí mravenci s rostlinami: je myrmekofilie významná pro utváření ekosystémů?. *Živa*, **60**, 205 - 209.
43. Sněženka podsněžník. In: *Květena ČR* [online]. 2013 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=3>
44. Introduction. In: *CITES Bulbs* [online]. 2011 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://citesbulbs.myspecies.info/content/introduction>
45. Rønsted N, Zubov D, Bruun-Lund S, Davis A P. (2013) Snowdrops falling slowly into place: An improved phylogeny for *Galanthus* (Amaryllidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 205-217.
46. *Galanthus elwesii* Hook.f. In: *CITES Bulbs* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://citesbulbs.myspecies.info/category/galanthus-wild-species/galanthus-elwesii>
47. *Missouri Botanical Garden* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.missouribotanicalgarden.org/>
48. *Snowdropinfo* [online]. 2012 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: <http://www.snowdropinfo.com/>
49. *Galanthus 'Comet'*. In: *JEARRARD'S HERBAL* [online]. 2008 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.johnjearrard.co.uk/plants/galanthus/galanthuscomet/species.html>
50. *Galanthus 'Godfrey Owen'*. In: *Alpine Garden Society* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.alpinegardensociety.net/plants/joint-rock/awards/jointrockmeeting/Joint+Rock+Meeting+Westminster+/18/>
51. *Elwesii "White Perfection"*. In: *Judy's Snowdrops* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: [http://www.judyssnowdrops.co.uk/Plant\\_Profiles/Elwesii/white\\_perfection/white\\_perfection.htm](http://www.judyssnowdrops.co.uk/Plant_Profiles/Elwesii/white_perfection/white_perfection.htm)
52. *Galanthus nivalis* - sněženka podsněžník. In: *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K284.php>

53. *Galanthus nivalis*. In: *Crocus* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: [http://www.crocus.co.uk/plants/\\_galanthus-nivalis/classid.2000008234/](http://www.crocus.co.uk/plants/_galanthus-nivalis/classid.2000008234/)
54. Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. (2011) Alkaloid Diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 115-130.
55. Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. (2008) Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 638-645.
56. Berkov S, Cuadrado M, Osorio E, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2009) Three New Alkaloids from *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii*. *Planta Medica*, **75**, 1351-1355.
57. Davis A P, Özhatay N. (2001) *Galanthus trojanus*: a new species of *Galanthus* (Amaryllidaceae) from north-western Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **137**, 409-412.
58. *Galanthus trojanus*. In: *The IUCN Red List of Threatened Species(tm)* [online]. 2013 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/164902/0>
59. Kaya G I, Sarikaya B B, Onur M A, Somer N U, Viladomat F, Codina C, Bastida J, Lauinger I L, Kaiser M, Tasdemir D. (2011) Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochemistry Letters*, **4**, 301-305.
60. *Galanthus rizehensis* Stern. In: *Amaryllidaceae* [online]. 2013 [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://amaryllidaceae.e-monocot.org/taxonomy/term/8961>
61. Sarikaya B B, Kaya G I, Onur M A, Viladomat F, Codina C, Bastida J, Somer N U. (2012) Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. *Phytochemistry Letters*, **5**, 367-370.
62. Sarikaya B B, Zencir S, Somer N U, Kaya G I, Onur M A, Bastida J, Berenyi A, Zupko I, Topcu Z T. (2012) The Effects of Arolycoricidine and Narciprimine on Tumor Cell Killing and Topoisomerase Activity. *Records of Natural Products*, **6**, 381 - 385.

63. Cao Z, Yang P, Zhou Q. (2013) Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, **56**, 1382-1391.
64. Lamoral-Theys D, Decaestecker C, Mathieu V, Dubois J., Kornienko A, Kiss R, Eevidente A, Pottier L. (2010) Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **10**, 41-50.
65. Zupkó I, Réthy B, Hohmann J, Molnár J, Ocsovszki I, Falkay G. (2009) Antitumor Activity of Alkaloids Derived from Amaryllidaceae Species. *In vivo*, **23**, 41 - 48.
66. Kihara M, Xu L, Konishi K, Kida K, Nagao Y, Kobayashi S, Shingu T. (1994) Isolation and Structure Elucidation of a Novel Alkaloid, Incartine, a Supposed Biosynthetic Intermediate, from Flowers of *Lycoris incarnata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **42**, 289-292.
67. Berkov S, Reyes-Chilpa R, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2007) Revised NMR data for Incartine: an Alkaloid from *Galanthus elwesii*. *Molecules*, **12**, 1430-1435.
68. Havlasová J, Šafratová M, Siatka T, Štěpánková Š, Novák Z, Ločárek M, Opletal L, Hrabínová M, Jun D, Benešová N, Kuneš J, Cahlíková L. (2014) Chemical Composition of Bioactive Alkaloid Extracts from Some *Narcissus* Species and Varieties and their Biological Activity. *Natural Product Communications*, **9**, 1151 - 1155.
69. Jovanović S, Tomović G, Lakušić D, Niketić M, Pavlović M, Boža P. (2009) Genus *Leucojum* L. (Amaryllidaceae): distribution and threatened status in Serbia. *Botanica Serbica*, **33**, 45 - 50.
70. *BioLib* [online]. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/>
71. LEUCOJUM AESTIVUM L.: bledule letní / bleduľa letná.  
In: *BOTANY.cz* [online]. 2007 [cit. 2015-04-04].  
Dostupné z: <http://botany.cz/cs/leucojum-aestivum/>

72. Kobayashi S, Kihara M, Yuasa K, Imakura Y, Shingu T, Kato A, Hashimoto T. (1985) Alkaloidal constituents of *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 5258-5263.
73. Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2008) N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18**, 2263-2266.
74. Ivanov I, Georgiev V, Berkov S, Pavlov A. (2012) Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 206-211.
75. Acis. In: *Pacific Bulb Society* [online]. 2013 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Acis>
76. Acis autumnalis – Autumn Snowflake. In: *University of St Andrews* [online]. 2011 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: [http://www.st-andrews.ac.uk/~gdk/stabg\\_new/poms/2011/sep11pom.htm](http://www.st-andrews.ac.uk/~gdk/stabg_new/poms/2011/sep11pom.htm)
77. Kihara M, Ozaki T, Kobayashi S, Shingu T. (1995) Alkaloidal Constituents of *Leucojum autumnale* L. (Amaryllidaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **43**, 318-320.
78. Nepochikované výsledky, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK, Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.
79. Weniger B, Italiano L, Beck J-P, Bastida J, Bergeño S, Codina C, Lobstein A, Anton R. (1995) Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*, **61**, 77-79.
80. Berkov S, Sidjimova B, Evstatieva L, Popov S. (2004) Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, **65**, 579-586.
81. Latvala A, Onur M A, Gözler T, Linden A, Kivçak B, Hesse M. (1995) Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, **39**, 1229-1240.

82. Sarikaya B B, Kaya G I, Onur M A, Bastida J, Somer N U. (2013) Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **51**, 276-279.
83. Evidente A, Iasiello I, Randazzo G. (1984) Isolation of Sternbergine, a New Alkaloid From Bulbs of *Sternbergia lutea*. *Journal of Natural Products*, **47**, 1003-1008.
84. *Royal Botanic Gardens, Kew* [online]. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: <http://www.kew.org/>
85. *Galanthus woronowii* Losinsk. In: *Amaryllidaceae* [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://amaryllidaceae.e-monocot.org/taxonomy/term/8963>
86. Forgo P, Hohmann J. (2005) Leucovernine and Acetylleucovernine, Alkaloids from *Leucojum vernum*. *Journal of Natural Products*, **68**, 1588-1591.
87. *Leucojum vernum* L. In: *Altervista: Flora of North America* [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Leucojum+vernum>
88. Vaněk V, Ondrušková L, Petrová E, Václavík J. (1974) *Tulipány, narcisy, hyacinty*. SZN, Praha, 1 - 197.
89. *Narcissus Large Cupped Professor Einstein*. In: *Longfield Gardens* [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.longfield-gardens.com/plantname/Narcissus-Professor-Einstein>
90. *Daffodil (Narcissus 'Quirinus')*. In: *All Things Plants* [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://allthingsplants.com/plants/view/508410/Daffodil-Narcissus-Quirinus/>
91. *Beervelde* [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.parkvanbeervelde.be/>
92. *Daffodils Virginia Sunrise*. In: *Tesselaar* [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <https://www.tesselaar.net.au/genus/narcissus/4024-daffodils-virginia-sunrise>

93. *Martin Viette Nurseries* [online]. 2014 [cit. 2015-04-03]. Dostupné z:  
<http://www.martinviette.com/>

## **8 SEZNAM ZKRATEK**

**Aβ** amyloid beta

**acetyl-CoA** acetylkoenzym A

**AD** Alzheimerova choroba

**ACh** acetylcholin

**AChE** acetylcholinesterasa

**AmA** *Amaryllidaceae* alkaloidy

**AMK** aminokyselina

**AMPA** receptory amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové receptory

**APP** amyloidní prekurzorový protein

**ASAD** Alzheimer's Disease Assessment Scale

**BuChE** butyrylcholinesterasa

**BPSD** behaviorální a psychologické symptomy u demencí

**CDT** Clock Drawing Test

**CITES** Convention on International Trade in Endangered Species

**COX-2** cyklooxygenasa 2

**cv.** kultivar

**DAD** Disability Assessment for Dementia

**DTNB** 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

**Et<sub>2</sub>O** diethylether

**EtOAc** ethylacetát

**EtOH** ethanol

**GC** plynová chromatografie



**H5N1** virus ptačí chřipky

**HEB** hematoencefalická bariéra

**HIV** Human Immunodeficiency Virus

**HuAChE** humánní acetylcholinesterasa

**HuBuChE** humánní butyrylcholinesterasa

**IVIG** intravenózní imunoglobuliny

**MMSE** Mini-Mental State Examination

**MRI** magnetická rezonance

**MS** hmotnostní spektrometrie

**NINCDS-ADRDA** National Institute of Neurological and Communicative Disorders –  
Alzheimer's Disease and Related Dementias Association

**NIST** National Institute of Standards and Technology Library

**NMDA** receptory N-methyl-D-aspartátové receptory

**NMR** nukleární magnetická rezonance

**PET** pozitronová emisní tomografie

**POP** prolyloligopeptidasa

**RT** retenční čas

**SARS** Severe Acute Respiratory Syndrome

**TIC** totální iontový proud

## Abstrakt

Více než 50 % všech případů demence je způsobeno Alzheimerovou chorobou (AD). Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění působící postupnou ztrátou paměti, poruchy orientace i chování, jež zasahují do pacientova sociálního i pracovního života. AD je charakteristická ztrátou neuronů v určitých oblastech mozku – na příklad v hipokampu či kůře. Etiopatogeneze vzniku AD není ještě zcela známa, proto je léčba pouze symptomatická. Důležitou roli hraje vznik extracelulárních plaků proteinu  $\beta$  amyloidu ( $A\beta$ ) okolo neuritů, což vede k jejich degeneraci a následné buněčné smrti.  $A\beta$  se podporuje vznik volných kyslíkových radikálů, což vede ke smrti neuronů, stejně jako intracelulárně vznikající uzlíky  $\tau$  proteinu. Dalším z problémů je nerovnováha glutamatergního systému, jehož fyziologická funkce je nezbytná pro správnou tvorbu paměti. U pacientů s AD dochází k přílišné aktivaci tohoto systému, což vede ke vzniku šumů mezi neurony a ztížení přenosu nervového vzruchu, excitotoxicitě a apoptóze neuronů. U pacientů trpících AD je také snížena koncentrace neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v mozku, což přispívá k rozvoji onemocnění. ACh je fyziologicky na synapsi rozkládán enzymem acetylcholinesterasou (AChE). Druhým enzymem, který se podílí na rozkladu ACh, je butyrylcholinesterasa (BuChE). V pokročilých stádiích AD může být hladina ACh a cholinacetyltransferasy snížena až o 90 % oproti normálním fyziologickým koncentracím, zatímco koncentrace BuChE se zvyšuje a nabývá na významu. Proto je perspektivní výzkum za účelem najít duální inhibitory AChE i BuChE.

Rody *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus* náleží do čeledi *Amaryllidaceae*. Rostliny této čeledi obsahují široké spektrum sekundárních metabolitů nazývaných jako *Amaryllidaceae* alkaloidy. Tyto alkaloidy vykazují celou škálu biologických účinků, jako je účinek protizánětlivý, protivirový, antineoplastický, antimykotický, antibakteriální, antiparazitický a v neposlední řadě inhibují erytrocytární AChE a sérovou BuChE.

Byly získány sumární alkaloidní extrakty z cibulí sedmi vybraných druhů a kultivarů (*Galanthus elwesii*, *Galanthus woronowii*, *Leucojum vernum*, *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT, *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, *Narcissus* cv. QUIRINUS and *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE) a ty byly podrobeny GC/MS

analýze. Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány pomocí svých hmotnostních spekter, retenčních časů a indexů. Sumární extrakty byly pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody testovány *in vitro* na schopnost inhibovat humánní AChE (HuAChE) a BuChE (HuBuChE). Inhibiční aktivity sumárních alkaloidních extraktů vůči cholinesterasám byly porovnávány s pozitivním standardem galanthaminem ( $IC_{50, \text{HuAChE}} = 1.710 \pm 0.007 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 42.30 \pm 1.30 \mu\text{M}$ ).

## **Klíčová slova**

*Amaryllidaceae*, alkaloidy, GC/MS, Alzheimerova choroba, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus*.

## Abstract

More than 50 % cases of dementia are nowadays caused by Alzheimer's disease (AD). AD is a progressive neurodegenerative disease and it causes gradual memory loss, disorientation and behavioral disorders which affect patient's social and occupational life. AD is characteristic by loss of neurons in some regions of brain – for example hippocampus and cortex. Etiopathogenesis of this disease is not completely known – that is why the treatment is still just symptomatic. Formation of  $\beta$ -amyloid deposits in brain tissue plays an important role - it is a protein which creates extracellular plaques around neurites and causes their degeneration and death. Intracellular tangles are made up of the changed  $\tau$ -protein. These tangles also cause death of the neuronal cell. The degeneration of neurons is supported by reactive oxygen radicals too. The another problem is a glutamatergic system disorder. This set of excitatory amino acids is important for correct long-term memory formation. Patients with AD suffer from glutamatergic system overactivation which leads to the formation of neuronal perturbation, excitotoxicity and apoptosis of neuronal cells. In patients with AD the acetylcholine (ACh) production is damaged. ACh is a neurotransmitter and its lack participates in the development of AD. ACh is physiologically decomposed by enzyme acetylcholinesterase (AChE). The second enzyme taking part in ACh degradation is a butyrylcholinesterase (BuChE). In severe forms of AD, levels of AChE and cholineacetyltransferase are decreased by as much as 90 % compared with normal condition, while the concentration of BuChE increases. That's why the new inhibitors with dual enzymatic activity against AChE and also BuChE are sought.

*Galanthus*, *Leucojum* and *Narcissus* species belong to *Amaryllidaceae* family. Plants of this family produce wide range of specific chemical substances called *Amaryllidaceae* alkaloids. These alkaloids have various biological effects like anti-inflammatory, antiviral, antineoplastic, antiparasitic, antimycotic and they are also able to inhibit erythrocytic AChE (HuAChE) and serum BuChE (HuBuChE).

Alkaloidal extracts of seven selected species and cultivars (*Galanthus elwesii*, *Galanthus woronowii*, *Leucojum vernalis*, *Leucojum aestivum* cv. GRAVETYE GIANT, *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, *Narcissus* cv. QUIRINUS and *Narcissus* cv. VIRGINIA SUNRISE) were analysed by GC/MS and alkaloids were identified from

their mass spectra, retention times and retention indexes. Summary extracts were tested *in vitro* for their ability to inhibit HuAChE and HuBuChE using Ellman's method. Inhibitory activity of summary alkaloidal extracts were compared with positive standard galanthamine ( $IC_{50,HuAChE} = 1.710 \pm 0.007 \mu M$ ;  $IC_{50,HuBuChE} = 42.30 \pm 1.30 \mu M$ ).

## **Keywords**

Amaryllidaceae, alkaloids, GC/MS, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus*.