

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

**Železo – chelatační aktivita vybraných alkaloidů III.**

**Iron – chelating activity of selected alkaloids III.**

Diplomová práce

Vypracovala: Dočekalová Linda

Školitel: Ing. Macáková Kateřina, Ph.D.

Akademický rok 2015/2016

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne .....

Linda Dočekalová

## **1 Poděkování**

Ráda bych poděkovala Ing. Kateřině Macákové Ph.D., školitelce mé diplomové práce, za rady a pomoc během zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat členům výzkumné skupiny ADINACO, kteří izolovali a poskytli k testování alkaloidy použité pro měření v rámci této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala celé Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí možnosti vypracovat experimentální část diplomové práce v jejích prostorách. Tento výstup vznikl za podpory projektu SVV 260 292.

## **2 Obsah**

1	Poděkování .....	3
2	Obsah .....	4
3	Abstrakt .....	6
4	Abstract.....	8
5	Úvod .....	10
6	Cíl práce.....	12
7	Teoretická část.....	13
7.1	Metabolismus železa a jeho funkce v organismu.....	13
7.1.1	Metabolismus železa.....	13
7.1.2	Význam železa a jeho funkce .....	15
7.2	Patologie železa.....	17
7.2.1	Nedostatek železa .....	17
7.2.2	Nadbytek železa.....	18
7.3	Chelatace železa .....	22
7.3.1	Chelátory železa v humánní terapii .....	22
7.4	Charakteristika testovaných látek a jejich biologická aktivita.....	24
7.4.1	Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae.....	24
8	Experimentální část .....	33
8.1	Materiál .....	33

8.1.1	Použité chemikálie .....	33
8.1.2	Testované látky .....	33
8.1.3	Přístroj.....	34
8.2	Metody .....	34
8.2.1	Příprava zásobních roztoků a roztoků pufrů .....	34
8.2.2	Zkouška pro železnaté ionty .....	35
8.2.3	Zkouška pro železité ionty .....	35
8.2.4	Kalibrace železnatých iontů.....	35
8.2.5	Chelatace železnatých iontů.....	36
8.2.6	Chelatace Fe <sup>2+/3+</sup> iontů .....	38
8.2.7	Redukce železitých iontů .....	39
9	Výsledky.....	41
9.1	Kalibrační křivka železnatých iontů.....	41
9.2	Chelatační aktivita jednotlivých alkaloidů.....	41
9.3	Redukční aktivita jednotlivých alkaloidů.....	48
10	Diskuze .....	49
11	Závěr .....	52
12	Seznam zkratk .....	53
13	Použitá literatura .....	54

### 3 Abstrakt

Dočekalová L., Železo-chelatační aktivita vybraných alkaloidů III. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2016, 60 s.

Železo se řadí mezi stopové prvky nezbytné pro lidský organismus. Při jeho nadbytku dochází k tvorbě volných radikálů a poškozování struktur organismu, což má za následek až selhávání orgánů. Tento nadbytek se řeší za pomoci chelátorů, nejužívanějším je deferoxamin. Má však nevýhodný terapeutický režim a mnoho nežádoucích účinků, proto se hledají látky s lepšími vlastnostmi.

Tato práce byla zaměřena na studium železo-chelatačních vlastností vybraných alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae. Konkrétně se jedná o galanthamin, undulatin, buphanisin, karantin, 1-O-acetylbulbisin, homolykorin, tazettin, chlidanthin, ambellin, hemanthamin, hemanthidin, hamayn, 9-O-demethylgalanthin a lykoramin. Jako standard pro srovnání aktivity byl použit deferoxamin. Aktivita byla měřena pomocí spektrofotometru. Jako indikátor iontů  $\text{Fe}^{2+}$  byl použit ferozin. Chelatace byla měřena pro ionty  $\text{Fe}^{2+}$  a pro celkové železo, kde se jako redukční činidlo použil hydroxylamin. Ionty  $\text{Fe}^{2+}$  byly také měřeny za úpravy pH.

Nejvyšší aktivitu vykázal při všech měřeních deferoxamin. Při měření iontů  $\text{Fe}^{2+}$  v poměru 1:1 chelátátoru k železu prokázaly aktivitu blížíící se k deferoxaminu chlidanthin, buphanisin, undulatin, lykoramin, hemanthamin, 1-O-acetylbulbisin, 9-O-demethylgalanthin a ambellin. Při úpravě pH vykazovaly všechny alkaloidy velice slabou nebo žádnou aktivitu. Galanthamin neprokázal žádnou chelatační aktivitu v žádném z měření.

Ze vztahu mezi strukturou a účinkem vyplývá, že aktivitu snižuje, když je dusík molekuly vázán v pětičlenném heterocyklu s navázaným methylovým substituentem. Aktivitu zvyšuje acetylace molekuly. U alkaloidů galanthaminové struktury způsobuje umístění -OH skupiny v poloze 3, v sousedství s dvojnou vazbou v poloze

4, úplnou ztrátu chelatačního účinku. Hydrogenací kruhu nebo nahrazením -OH skupiny skupinou -OCH<sub>3</sub> vznikají molekuly s dobrými chelatačními schopnostmi.

U zkoumaných látek byla také měřena jejich schopnost redukovat ionty Fe<sup>3+</sup> na ionty Fe<sup>2+</sup>. Žádná z látek redukční schopnosti neměla.

## 4 Abstract

Dočekalová L., Iron-chelating activity of selected alkaloids III, Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical botanic and ecology, Hradec Králové, 2016, 60 pp.

Iron is important trace element necessary for human organism. When excess it develops free radicals and structures of organism are harmed. It can lead to organ failure. Excess is solved with chelators, the most used is deferoxamine. But his therapeutic regimen is disadvantageous and it has a lot of side effects. That's reason for searching for substances with better features.

This paper focuses on studium of iron-chelating activity of selected alkaloids from family Amaryllidaceae. Concretely, it's galanthamine, undulatine, buphanisine, caranine, 1-O-acetylbulbisine, homolycorine, tazettine, galanthamine, chlidanthine, ambelline, haemanthamine, haemanthidine, hamayne, 9-O-demethylgalanthine and lycoramine. As standard for comparison of activity was used deferoxamine. Activity was measured by spectrophotometer. As indicator was used ferrozine. Chelation was measured for ferrous ions and for total iron, where hydroxylamine as reduction agent was used. Ferrous ions was measured also with pH alteration.

Highest activity reached deferoxamine in all executed measurements. In measurement of  $\text{Fe}^{2+}$  ions in the ratio 1:1 alcaloid: $\text{Fe}^{2+}$  showed activity close to deferoxamin chlidanthine, buphanisine, undulatine, lycoramine, haemanthamine, 1-O-acetylbulbisine, 9-O-demethylgalanthine and ambelline. With pH alteration showed all alkaloids low or none activity. Galanthamine had none activity in all measurements.

Structure-activity relationship shows that activity decreases when nitrogen is bonded in 5 membered heterocycle with bound methyl substituent. Activity increases with acetylation of the molecule. For alkaloids of galanthamine structure, the location of -



-OH group in position 3 near to double bond in position 4, causes complete lost of chelating acitivity. By hydrogenation of the circle, or substitution -OH group with -OCH<sub>3</sub> group, are created molecules with good chelating activity.

It was also studied ability to reduce ferric ionts to ferrous ionts. None activity was found.

## 5 Úvod

Stopové prvky tvoří pouze 0,01 % atomů v lidském těle, přesto jsou pro jeho správné fungování nezbytně důležité. Jedním z nejdůležitějších z nich je železo, kovový prvek sloužící mimo jiné k syntéze krevního a svalového barviva hemoglobinu a myoglobinu. Podílí se tak na transportu kyslíku krví. Dále slouží k přenosu elektronů v dýchacím řetězci či je součástí cytochromů účastnících se metabolismu xenobiotik.<sup>1 2 3 4</sup>

V běžných podmínkách se železo může vyskytovat ve 2 stabilních oxidačních stavech, jako  $\text{Fe}^{2+}$  a jako  $\text{Fe}^{3+}$ , díky čemuž sehraává roli v oxidoredukčních reakcích, při kterých dochází k přenosu 1 elektronu. Právě díky tomu nachází svou úlohu při důležitých pochodech organismu. Tato schopnost však může být pro organismus i velmi nebezpečná. Volné železo se účastní Fentonovy reakce, během které vznikají hydroxylové radikály. Díky těm pak dochází k poškození buněčných struktur a ke vzniku oxidačního stresu.<sup>5</sup>

Přetížení organismu železem mívá obvykle chronický charakter a může vyústit v poškození jater, myokardu či pankreatu. Takovým případem je hemochromatóza, dědičná porucha metabolismu železa, při které dochází k několikanásobně zvýšenému vstřebávání železa z trávicího traktu. Organismus neumí železo účinně odbourat a to se patologicky ukládá do řady orgánů a poškozuje je. S přetížením železem se potýkají i nemocní, jejichž zdravotní stav vyžaduje opakované krevné transfúze.<sup>6</sup>

Nadbytečné železo je proto potřeba z organismu účinně odstranit. Řešení může nabídnout chelatační léčba. Doposud užívané preparáty nedosahují ideálních účinků a mají řadu účinků nežádoucích, proto je stále potřeba hledat a vyvíjet nové účinnější a bezpečnější chelátory.<sup>7</sup> Proto se tato diplomová práce zabývá stanovením železo-chelatační aktivity vybraných alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae. Zároveň je nežádoucí, aby měly chelátory schopnost redukovat ionty  $\text{Fe}^{3+}$  na ionty  $\text{Fe}^{2+}$  kvůli

možné indukci Fentonovy reakce. Proto byla kromě železo-chetační aktivity studována též redukční aktivita alkaloidů.<sup>8</sup>

Alkaloidy Amaryllidaceae jsou známé především svojí inhibiční aktivitou vůči acetylcholinesteráze (AChE). Galanthamin, jeden z nejvýznamnějších alkaloidů této čeledi, je díky svému silnému inhibičnímu vlivu na AChE využíván jako léčivo v terapii Alzheimerovy choroby. Nemocní trpící Alzheimerovou chorobou mají sníženou syntézu acetylcholinu. Inhibitory AChE zpomalují degradaci acetylcholinu a prodlužují tak dobu jeho působení na receptorech. Galanthamin díky tomu napomáhá zpomalovat postup onemocnění a zmírňuje jeho příznaky.<sup>9</sup>

Zajímavá je i antiproliferativní a cytotoxická aktivita alkaloidů této čeledi, některé alkaloidy vykazují účinky proti určitým typům rakovinného bujení, mohly by tedy být v budoucnu slibnými léčivy pro boj s rakovinou.<sup>10</sup>

## **6 Cíl práce**

Cílem této diplomové práce je:

- změřit železo-chelatační aktivitu vybraných alkaloidů v různých koncentracích a porovnat ji se standardem (deferoxamin)
- odvodit vztahy mezi strukturou těchto alkaloidů a jejich železo-chelatační aktivitou
- změřit redukční aktivitu vybraných alkaloidů v různých koncentracích

## 7 Teoretická část

### 7.1 Metabolismus železa a jeho funkce v organismu

#### 7.1.1 Metabolismus železa

V lidském těle se vyskytuje v průměru 4 až 5g železa. Je zabudováno v hemoglobinu, myoglobinu, tvoří součást cytochromů, v tkáních jej nalezneme v játrech, v retikuloendotelovém systému (RES) a ve střevní sliznici.<sup>1</sup>

Denní příjem železa činí cca 20 mg, z toho se absorbuje jen asi 1 mg, zbytek odchází stolicí. Absorpce závisí na aktuální potřebě, stoupá spolu se ztrátami železa. K vyšší absorpci dochází např. u menstrujících žen či pacientů krvácejících do gastrointestinálního traktu (GIT). Musí být regulována velice přesně, neboť organismus neumí nadbytečné železo účinně vylučovat. Mechanismus této regulace zatím není zcela objasněný. Nejvíce železa potřebují děti, těhotné a kojící ženy. Z potravy je železo nejvíce zastoupené v masu, játrech, žloutcích a zelenině. Pro úspěšnou absorpci je nutné, aby železo rozštěpené v žaludku na ionty  $\text{Fe}^{3+}$  změnilo oxidační číslo na  $\text{Fe}^{2+}$ . Tuto redukci pomáhá uskutečnit vitamín C obsažený v potravě. Kyselé prostředí zprostředkované HCl poté navozenou redukovanou formu dále udržuje. Samotná absorpce se odehrává hlavně v duodenu a proximálním jejunu, proces usnadňuje glykoprotein gastroferin produkovaný sliznicí žaludku. Vstřebávání naopak snižují ionty hořčíku a vápníku, hydrogenuhličitan sodný aj. Proto se při medikamentózní substituci železa nedoporučuje současná konzumace mléka, kávy, alkalických minerálek, či černého a zeleného čaje.<sup>1 2 3 4 5 11</sup>

Železo vstřebané v tenkém střevě může být dočasně uloženo v enterocytech jako feritin (viz dále), odkud může být vyloučeno deskvamací buněk. Z enterocytů dále prostupuje do krevní plasmy, odkud je přenášeno transportním proteinem apotransferinem do tkání. Jedna molekula apotransferinu má dvě vazebná místa pro  $\text{Fe}^{3+}$ , obvykle je tato kapacita nasycena z 1/3. Transferin, apotransferin s navázaným železem, je buňkami zachytáván pomocí specifických membránových receptorů pro transferin a železo v něm obsažené se dostává endocytózou do buňky, kde je dále

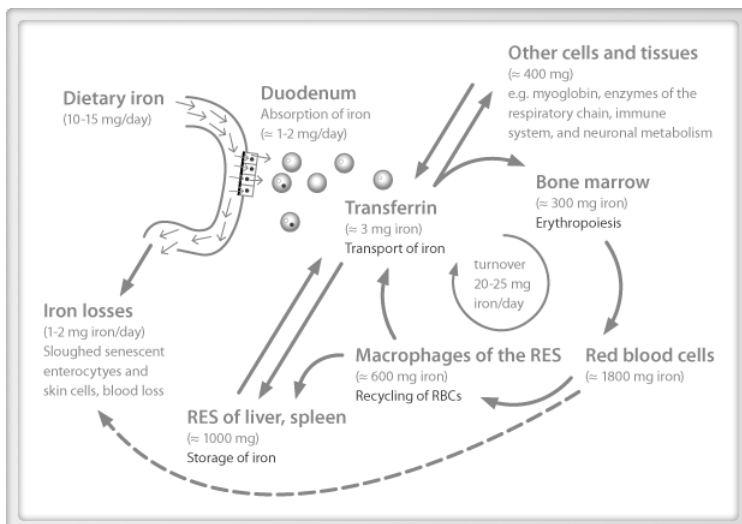
využito. Největší část je zabudována do hemu nezralých erytroidních buněk či je uložena a tvoří zásoby železa v organismu.<sup>1 2 4 5</sup>

Železo se v tkáních ukládá v oxidované formě do proteinu apoferritinu, vzniklý ferritin tvoří zásobárnu železa organismu. Organismus se tímto způsobem skladování chrání před toxickými účinky jeho volné formy. Nejvíce se ukládá v buňkách jater, sleziny a v kostní dřeni. V lidském těle nacházíme i další formu zásobního železa, hemosiderin, který nejspíš vzniká degradací ferritinu. Železo z něj je obtížně využitelné.<sup>1 2 4</sup>

V lidském těle nenalézáme mechanismus na odstranění přebytečného železa. Nemůžeme proto mluvit o vylučování železa jako takovém, železo odchází z těla především odlupováním buněk střevní sliznice, kde je uskladněné ve formě ferritinu. U žen navíc dochází ke ztrátám železa menstruační krví. Muži v průměru ztratí pouhých 0,5 – 1 mg železa denně, ženy asi dvojnásobné množství. Proto se při jeho nadměrné absorpci snadno může hromadit ve tkáních a vážně je poškozovat.<sup>2</sup>

Většinu železa potřebného ke správným tělesným funkcím však organismus nezískává jeho vstřebáváním z potravy, to slouží jen k doplnění drobných ztrát, nýbrž reutilizací železa, které již má k dispozici. Většina je získávána při degradaci hemoglobinu v RES sleziny a kostní dřeni. Uvolněné železo endocyticky pohlcují makrofágy a opět ho předávají apotransferinu.<sup>2 6</sup>

Metabolismus železa je schematicky znázorněn na obrázku 1.



Obr. 1. Schematické znázornění pohybu železa v organismu<sup>12</sup>

### 7.1.2 Význam železa a jeho funkce

Železo je nezbytně nutné pro přenos kyslíku krví, tvoří základ červeného krevního barviva, hemoglobinu. Hemoglobin reverzibilně váže a uvolňuje kyslík a transportuje ho krevním oběhem do buněk. Je tvořený čtyřmi podjednotkami, každá se skládá z bílkoviny globinu a prostetické skupiny hemu. Hem je chelát, jeho centrální atom tvoří koordinčně šestivazný  $\text{Fe}^{2+}$ . Čtyři vazby váží dusíky protoporfyrinu IX, pátá slouží ke spojení s globinem a šestá váže v oxygenovaném stavu kyslík. Kromě kyslíku se hemoglobin podílí i na přenosu oxidu uhličitého a má puffrovací schopnosti, nezbytné pro udržení pH krve.<sup>1</sup>

Dalším barvivem je myoglobin, strukturou i funkcí podobný hemoglobinu, který váže kyslík ve svalech a vytváří zásobu kyslíku pro sval.<sup>1 5</sup>

Železo dále nacházíme v některých cytochomech. Například v mitochondriích se účastní jako součást cytochromů oxidoredukčních reakcí v dýchacím řetězci. Je také součástí široké škály enzymů, které katalyzují nejrůznější oxidoredukční reakce organismu. Podílí se na aktivaci a detoxifikaci kyslíku, nalezneme jej v reakcích Krebsova cyklu, podílí se na vzniku deoxyribonukleotidů, jako součást cytochromu P450 se účastní metabolismu xenobiotik v játrech.<sup>5</sup>

Svou roli sehrává železo i při obraně organismu před infekcí. Patogenní organismy (bakterie, prvoci, houby) získávají železo nezbytné pro své fungování z organismu hostitele, mají za tímto účelem vyvinuto více mechanismů. Jedním z nich je použití sideroforů vážících železo z plasmy či tělních sekretů. Reakcí organismu je proto snaha vyvázat volné železo a zabránit tak patogenům v přístupu k němu. V krevní plasmě se o vyvázání stará již zmiňovaný transferin, v tělních sekretech pak laktoferrin. Aby mohly patogeny uspět, potřebují siderofory s vyšší afinitou k železu, než má transferin.<sup>5</sup>



## 7.2 Patologie železa

### 7.2.1 Nedostatek železa

Nedostatek železa v organismu obvykle spojujeme se sideropenickou anémií. Tento nedostatek má vícero příčin. Jednak krvácení, sideropenickou anémií nacházíme u pacientů s okultním krvácením do GIT či u žen se silným menstruačním krvácením. Dále je to narušená recyklace železa vyskytující se u chronických infekcí. Makrofágy nedokáží odevzdat dostatečné množství železa apotransferinu a dochází k projevu nedostatku železa v podobě anémie. Mezi další příčiny nedostatku železa řadíme i jeho nedostatečný příjem, zvýšenou potřebu železa (růst, těhotenství, laktace) a narušení resorpce železa. Narušení resorpce železa je problémem u pacientů s chorobami tenkého střeva a s achlorhydrií (nepřítomnost HCl v žaludeční šťávě).<sup>6 13</sup>

Anémie obecně je onemocnění, při němž je snižená koncentrace hemoglobinu pod dolní fyziologickou mez, většinou bývá snížený i počet erytrocytů a hematokrit (podíl erytrocytů na celkovém objemu krve). Sideropenická anémie je anémie způsobená nedostatkem železa v organismu a je nejčastějším typem anémie v ČR i ve světě. Jedná se o anémii hypochromní a mikrocytární, erytrocyty jsou typické nedostatečným zbarvením a menší velikostí než je běžné. Můžeme ji poznat podle vyvíjející se skupiny příznaků, které vznikají při nedostatku kyslíku ve tkáních a podle kompenzačních mechanismů, které na tento stav reagují. Subjektivně nemocný pozoruje slabost, únavnost, závratě, poruchy bdění a spánku, dyspepsie, či bolesti hlavy. Objektivní příznaky zahrnují bledost, tachykardii s palpítacemi, pro sideropenickou anémií typické změny na nehtech – nehty mají lžičkovitý tvar a jsou lámavé a měkké. Nemocným se v koutcích úst tvoří záněty a trhlinky, jazyk je lesklý a pálí na špičce.<sup>13 14</sup>

Při sideropenické anémii pátráme po příčině nedostatku železa, kterou se pokoušíme léčit. Ztráty železa kompenzujeme perorálně, je-li to možné. Podávanými preparáty jsou obvykle sulfáty obohacené vitamínem C kvůli lepšímu vstřebávání, denně podáváme 100 – 200 mg.<sup>13</sup>

## 7.2.2 Nadbytek železa

Železo je pro správné fungování organismu nezbytně důležité, ve své volné formě však může napáchat velké škody. Při některých metabolických reakcích organismu vznikají reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS). Jedněmi z ROS jsou superoxidový anion a peroxid vodíku.  $\text{Fe}^{3+}$  může reakcí se superoxidovým anionem poskytnout  $\text{Fe}^{2+}$  a ten pak s peroxidem vodíku reaguje při Fentonově reakci. Při té z peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) vznikají vysoce reaktivní hydroxylové radikály ( $\text{OH}^\cdot$ ). Kyslíkové radikály produkují za fyziologických podmínek i mnohé organely, např. mitochondrie, peroxisomy nebo mikrosomy. Na ty jsou buňky připravené produkcí enzymů, které je odbourávají, jako například superoxidodismutáza, kataláza či glutathionperoxidáza.<sup>5</sup> Při nadbytku železa v organismu dochází k nasycení transferinu, nenasycené železo se volně pohybuje plasmou a buňky ho přijímají nezávisle na transferinovém receptoru. Buňky nestíhají zpracovávat radikály vznikající Fentonovou reakcí, což má za následek jejich poškození.<sup>7</sup>

Hydroxylové radikály spolu s dalšími kyslíkovými radikály katalyzují peroxidaci lipidů, díky čemuž dochází k poškození buněčných stěn, DNA či bílkovin. Významně se podílí na vzniku oxidačního stresu, který dlouhodobě poškozuje strukturu organismu. Má na svědomí změny spojené se stárnutím, neurodegenerativními chorobami (Alzheimerova a Parkinsonova choroba), kancerogenezí nebo diabetem.<sup>5</sup>

S nadbytkem železa v lidském organismu se setkáváme buď u akutních intoxikací, nebo je způsoben patologií v jeho metabolismu a dochází k postupnému ukládání železa do organismu. S hromaděním železa se setkáváme také u opakované parenterální aplikace železa a u opakovaných krevních transfúzí. Některé z těchto stavů budou níže popsány.

### 7.2.2.1 *Akutní intoxikace železem*

Železo začíná být pro dospělého toxické od množství 20 mg/kg. Nejčastěji se ale s intoxikací setkáváme u dětí předškolního věku, jedná se o jednu z nejčastějších příčin otrav u malých dětí. Železo je běžně dostupné ve formě doplňků stravy, obvykle v obsahu 20 mg v 1 tabletě, kterých, v případě nedbalého uložení v domácnosti, může

dítě bez problému zkonsumovat nebezpečné množství. Příznaky se začínají rozvíjet do 6 hodin od expozice, postižený pociťuje nevolnost, zvrací, přidávají se bolesti břicha a silný průjem. Při těžší otravě se poté začne rozvíjet tachykardie, hypotenze, kóma a metabolická acidóza, která může vyústit v úmrtí postiženého. V dalších fázích otravy se pak objevuje šok, selhávání jater a nevratné poškození trávicího traktu.<sup>15</sup>

Léčba se zahajuje irigací celé délky střev polyethylenglykolem. V této terapii se pokračuje, dokud při rentgenovém vyšetření vidíme rentgenkontrastní produkty železa. Výplach žaludku obvykle není potřeba díky předchozímu masivnímu zvracení postiženého. Při těžších otravách se nasazuje také deferoxamin, chelatační činidlo, které naváže volné železo v séru. Ty spolu vytvoří ve vodě rozpustný komplex, který se z těla vyloučí močí.<sup>15</sup>

### **7.2.2.2 Hemochromatóza**

Hemochromatóza je dědičné onemocnění, při kterém je narušen metabolismus železa a dochází k jeho hromadění v organismu. Jedná se o onemocnění autosomálně recesivní. Dochází ke zvýšenému vstřebávání železa v trávicím traktu a jeho následnému hromadění v orgánech, pro které je toxické. Jedná se především o játra, pankreas, srdce, kůži, klouby a varlata. Příčinou nemoci je porucha v syntéze proteinu HFE (human hemochromatosis protein). Heterodimer proteinu HFE a  $\beta_2$ -mikroglobulinu obsazuje receptor pro transferin na povrchu enterocyty. Po obsazení receptoru tímto heterodimerem klesá afinita receptoru k transferinu, nedochází tedy k resorpci železa z GIT. Není-li tento receptor obsazen, afinita k transferinu je vysoká a resorpce probíhá. Lidé trpící hemochromatózou takto přijmou o 0,5 – 1 g železa ročně víc než zdraví jedinci, železa se jim v těle může nahromadit až 60 g.<sup>6 13</sup>

Železo se v těle může hromadit i bez genetické příčiny při poruchách zužitkování Fe (např. při alkoholické cirhóze jater, po opakovaných krevních transfuzích, při thalassemii), pak obvykle mluvíme o hemosideróze.<sup>6 13</sup>

Při nadměrném ukládání železa dochází k poškození buněk, železo je velice reaktivní a podporuje tvorbu radikálů, ve volném stavu vyvolává již zmíněnou peroxidaci

lipidů buněčné membrány a poškození DNA. V játrech vyvolává aktivaci hvězdčovitých buněk (makrofágy), které se přeměňují v myofibroblasty produkující kolagen. Dochází k vývoji fibrózy a později cirhózy. Kupfferovy buňky (jaterní makrofágy) jsou železem rovněž aktivovány a začnou produkovat kyslíkové radikály. Všechny tyto děje nakonec vedou k nekróze hepatocytů. Obdobně dochází i k fibróze pankreatu, kde se díky fibrotizaci poruší syntéza inzulínu a vyvíjí se diabetes mellitus. Pozorujeme také změny na srdečním svalu, nemocný se následně potýká s arytmií až srdečním selháním. Ukládání nadbytečného hemosiderinu a melaninu do kůže způsobuje silnou pigmentaci, v kombinaci s poškozením pankreatu hovoříme o „bronzovém diabetu“.<sup>6 13</sup>

Symptomy nemoci jsou zpočátku nevýrazné, vyvíjí se obvykle až okolo 40. - 50. roku života, nemocný může být celoživotně i asymptomatický. U nemocného můžeme pozorovat slabost, bolesti břicha či impotenci. Pacient s rozvinutým onemocněním bývá letargický, při vyšetření objevujeme hepatosplenomegalii, dále ikterus, ascites, kožní změny, diabetes mellitus a projevy postižení srdce. Nalézáme vysoké laboratorní hodnoty saturace transferinu, sérového feritinu a zvýšený obsah železa v jaterní sušině.<sup>13</sup>

Léčba spočívá primárně v erythrocytafaréze, tedy odebrání krve pacientovi, odstranění nadbytečných erytrocytů a navrácení plasmy. V kombinaci s ní se využívá chelatační léčba, ta je prevencí proti dalšímu přetížení železem. Když je erythrocytafaréza nedostupná, užívá se venepunkce (pouštění žilou).<sup>5 13</sup>

### **7.2.2.3 Opakované krevní transfúze**

Část pacientů s hematologickými onemocněními je závislá na pravidelných krevních transfúzích. Typickým příkladem onemocnění, kdy jsou zapotřebí opakované krevní transfúze, je thalassemia major. U thalassemie dochází k poruše syntézy hemoglobinu, konkrétně globinového řetězce. Díky omezené syntéze řetězce dochází k nedostatku hemoglobinu a k narušení zabudování  $Fe^{2+}$  do struktury. Thalassemia major je homozygotní formou thalassemie a nemocní vyžadují celoživotní externí přívod hemoglobinu krevními transfuzemi. S jednou transfuzní jednotkou pacient

přijme 200 – 250 mg železa, denně organismus vyloučí 1 – 2 mg železa. Tato obrovská zátěž může vést k poškození orgánů, velice často pozorujeme kardiální onemocnění, srdeční selhání je častou nehematologickou příčinou úmrtí takto léčených pacientů. V současné době je jedinou možnou prevencí před vznikem komplikací spojených s nadbytkem železa chelatační léčba.<sup>6 16</sup>

### 7.3 Chelatace železa

Chelatace je proces, během kterého se na centrální atom naváže dvou nebo více vazebný ligand. Centrálním atomem bývá atomu kovu a ligandem nekovová, nejčastěji organická sloučenina. Vzniká komplexní cyklická sloučenina, kde je centrální atom obklopen ligandy. Takové sloučenině říkáme chelát. Příkladem přirozených chelátů může být hemoglobin s centrálním atomem železa, chlorofyl s centrálním atomem hořčíku či vitamín B12 s centrálním atomem kobaltu.<sup>17</sup>

Proces chelatace nachází využití mimo jiné v medicíně, využívá se schopnosti chelátorů vytvořit netoxický komplex s kovem, který je posléze vyloučen z organismu, obvykle močí nebo stolicí. Důležitá je stabilita vytvořeného komplexu kov-chelátor, různé komplexy mají různou stabilitu a může docházet k vytěsnění jednoho kationtu kationtem jiným, pokud má vyšší afinitu k chelátoru. Tento jev je s výhodou využíván při terapii otravy olovem, postiženému je podáván edetan vápenato-disodný ( $\text{Na}_2\text{Ca-EDTA}$ ). Olovo díky vyšší afinitě vytěsňuje vápník z vazby a nahradí jej. Pokud by byla použita samotná disodná sůl EDTA, došlo by v organismu k nebezpečnému snížení koncentrace vápníku.<sup>18</sup> EDTA je schopna vázat i ionty železa, ale její afinita k nim není příliš vysoká. Především však není schopná zakrýt celou plochu železa, kterému tak zůstává možnost katalyzovat nebezpečné redukční reakce.<sup>7</sup>

#### 7.3.1 Chelátory železa v humánní terapii

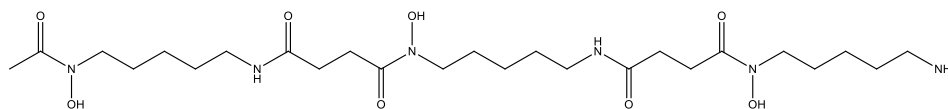
Ideální chelátor by měl být vysoce účinný, bezpečný, dobře tolerovaný, měl by mít nekomplikovaný způsob podání, mít minimum nežádoucích účinků a být dobře metabolizován a vylučován. V humánní terapii je nutné užívat chelátory s afinitou k  $\text{Fe}^{3+}$ , neboť chelátor může vyvazovat kromě železa i ostatní přítomné kovy s totožným nábojem. U náboje 3+ to není problém, další látkou, kterou může chelátor vyvázat, je hliník, který lze z organismu bez obav odstranit. Jiná situace by nastala u chelátoru s afinitou k náboji 2+, kromě železa by mohl vyvazovat i měď či zinek a tudíž by byl pro organismus toxický. Z tohoto důvodu hledáme a vyvíjíme nové chelátory s afinitou k trojvaznému železu.<sup>7</sup>

Nejvíce užívaným chelátorem je deferoxamin (Obr. 2), který chelatuje železo s nábojem 2+ i 3+. Vyvazuje jak volné železo v séru, tak i železo vázané ve feritinu a hemosiderinu. Nevstupuje do buněk ani nevyvazuje železo vázané v hemoglobinu, transferinu a cytochromech. Deferoxamin má i přes své dobré chelatační schopnosti velkou nevýhodu, a tou je jeho problematické podávání. Má rychlou renální clearance a po perorálním podání se neresorbuje. Vyžaduje proto téměř trvalou až trvalou subkutánní či intravenózní aplikaci, což je pro jeho využití silně omezující. Tento fakt silně snižuje i compliance pacientů. I přesto je v současnosti nejvíce užívaným chelátorem.<sup>7 11 16 18</sup>

Na trh jsou v současné době zavedeny i dva chelátory podávané perorálně, deferipron a deferasirox. Oproti deferoxaminu oba působí i intracelulárně.<sup>16</sup>

Deferipron byl prvním perorálním chelátorem na trhu. Užívá se rozdělený do 3 denních dávek. U pacientů užívajících deferipron byly zaznamenány menší depozity železa v myokardu než u pacientů léčených deferoxaminem. Deferipron může způsobovat agranulocytózu a neutropenii, pacienty je během léčby nutné důkladně sledovat.<sup>19</sup>

Deferasirox vyžaduje podání pouze 1x denně, má vysokou afinitu k železu a vykazuje dobré účinky i intracelulárně. Komplex deferasiroxu s trojmocným železem je vylučován především stolicí. Látka je relativně dobře tolerována, z nežádoucích účinků (NÚ) se pacienti potýkají s GIT obtížemi, jako jsou bolest břicha, nevolnost, zvracení a průjem. Ty však často bývají přechodné a postupně mizí. Vážné GIT NÚ zahrnují ulcerace a krvácení z horní části zažívacího traktu. Pacienty je také nutné pozorovat kvůli možnosti poruch renálních funkcí.<sup>16 20</sup>



Obr. 2 Deferoxamin

## 7.4 Charakteristika testovaných látek a jejich biologická aktivita

### 7.4.1 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy obecně jsou sekundární metabolity rostlin převážně zásadité povahy, které v molekule obvykle obsahují heterocyklicky vázaný dusík. Vznikají přeměnou jednoduchých aminokyselin.<sup>21</sup> Vyznačují se silnou biologickou aktivitou, jejich význam pro rostlinu však zatím není zcela objasněn, jednou z jejich hlavních funkcí je pravděpodobně ochrana před živočichy. Nalezneme je téměř ve všech částech rostliny, ať už volné, nebo častěji ve formě solí s organickými kyselinami.<sup>22</sup>

Čeď Amaryllidaceae (amarylkovité) zahrnuje mnoho rodů, v ČR jsou všeobecně známé rody jako bledule, sněženka, narcis či klívie. Rostliny bývají trvalky a rostou především v teplejších oblastech. Čeď je známá produkcí specifických alkaloidů, které se zdají být slibné jako zdroje budoucích léčiv a těší se proto zvýšenému zájmu vědy.<sup>21 23</sup>

Alkaloidy amarylkovitých mají širokou biologickou aktivitu. Zájem přitahují díky schopnosti silné inhibice AChE, alkaloid galanthamin je běžně užívaný při léčbě Alzheimerovy nemoci. Dále u nich prokázána cytotoxická, antiproliferativní, antibakteriální, antimykotická, analgetická a antimalarická aktivita. Jejich účinky na buňky a buněčný cyklus mohou být přínosné při hledání léčebných prostředků proti rakovině.<sup>10 23 24</sup>

Dle struktury jsou děleny do 6 skupin, galanthamin, lykorin a krinin tvoří základní strukturální typy, homolykorin, tazzetin a montanin vedlejší. Všechny tyto struktury mají společný prekurzor, norbelladin, což zapříčiňuje jejich strukturální podobnost.<sup>24</sup>

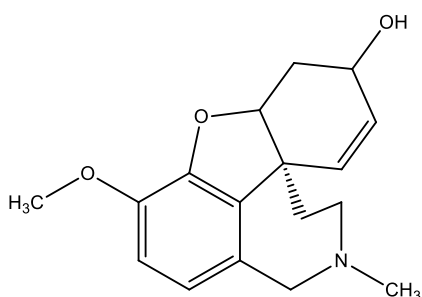
Při vypracování této práce byla měřena železo-chelatační aktivita níže vyjmenovaných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae.

#### **Galanthamin**

Galanthamin (Obr. 3) představuje jeden ze základních strukturálních typů této čeledi. Je významným kompetitivním reversibilním inhibitorem acetylcholinesterázy, užití



nachází při léčbě lehké až středně závažné formy Alzheimerovy nemoci.<sup>25</sup> Nemocní trpící Alzheimerovou nemocí mají sníženou syntézu acetylcholinu v presynaptické oblasti neuronů. Inhibitory AChE zpomalují degradaci acetylcholinu a prodlužují tak cholinergní neurotransmisi. Jejich užívání zmírňuje symptomy nemoci a zpomaluje její průběh.<sup>9</sup> Galanthamin kromě inhibice AChE také allostericky moduluje nikotinové acetylcholinergní receptory a potencuje tak cholinergní neurotransmisi, hovoříme o duálním mechanismu účinku. Během progresu onemocnění dochází k úbytku nikotinových receptorů, důležitých pro paměť a učení. Galanthamin má mezi ostatními inhibitory AChE specifické postavení. Je jediný, který je schopný vyvolat tuto modulaci a který tak zvyšuje množství funkčních nikotinových receptorů. Galanthamin též chrání buňky před apoptózou indukovanou amyloidem beta, proteinem, který se během Alzheimerovy nemoci patologicky ukládá v mozkové tkáni.<sup>26</sup> Působí neuroprotektivně i vůči nedostatku kyslíku a dalším škodlivým vlivům. Kromě působení na cholinergní systém a neuroprotektivního působení má galanthamin účinky protizánětlivé, způsobuje imunomodulaci a snížení uvolňování cytokinů.<sup>27</sup> Vykazuje též protinádorovou, protivirovou, imunostimulační a protimalarickou aktivitu.<sup>25</sup>

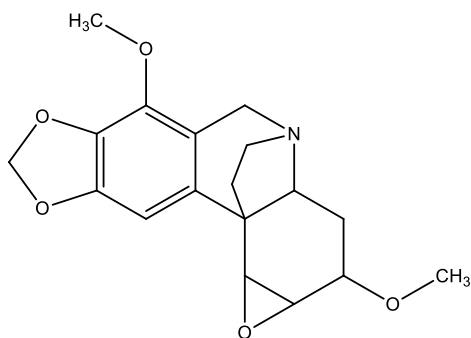


Obr. 3 Galanthamin

### Undulatin

Undulatin (Obr. 4) patří mezi alkaloidy krininového typu. Vykazuje cytotoxické účinky. Působí inhibičně na AChE, ale jeho působení je slabší než u galanthaminu.<sup>24</sup> Bylo zjištěno, že je schopný pasivně procházet přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Mohl by tedy být pomocníkem při hledání nových sloučenin

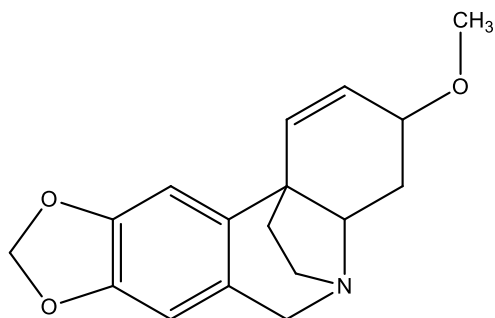
použitelných při léčbě Alzheimerovy nemoci. Dále se ukázalo, že je undulatin schopný inhibovat prolyl oligopeptidázu (POP).<sup>28</sup> POP je spojována s metabolismem neuropeptidů v mozku a s procesem učení a s pamětí. Nachází se uvnitř neuronů, proto je potřeba, aby její případné inhibitory byly schopné procházet přes HEB a přes membránu neuronu. Její inhibice by mohla pomáhat při léčbě pacientů trpících Alzheimerovou a Parkinsonovou nemocí.<sup>29</sup>



Obr. 4 Undulatin

### Buphanisin

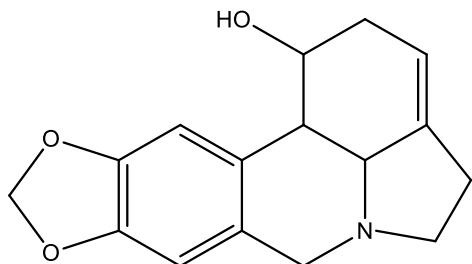
Buphanisin (Obr. 5) se řadí k alkaloidům krininového typu. Vykazuje schopnost inhibovat serotoninové transportéry v mozku, což naznačuje potenciální antidepresivní účinek.<sup>24</sup>



Obr. 5 Buphanisin

## Karanin

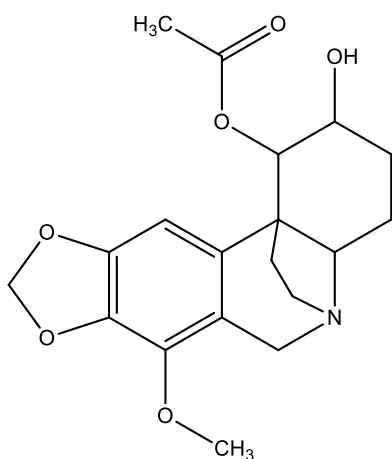
Karanin (Obr. 6), stejně jako mnoho dalších alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, způsobuje inhibici acetylcholinesterázy. Pozorujeme u něj také protinádorovou aktivitu, je schopný indukovat apoptózu. Dále má protivirovou, imunostimulační a antimalarickou aktivitu.<sup>25</sup>



Obr. 6 Karanin

## 1-O-acetylbulbisin

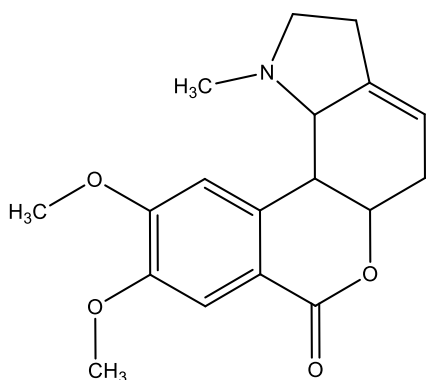
1-O-acetylbulbisin je dalším z alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Řadí se mezi alkaloidy krininového typu. Nalezneme jej například v listech rostliny *Crinum asiaticum var. sinicum*. Rostliny rodu *Crinum* rostou v Africe, jižní Asii, Americe a v Austrálii. Konkrétně *Crinum asiaticum var. sinicum* se vyskytuje v Číně.<sup>30</sup> Rostlina je zajímavá svým protinádorovým působením.<sup>21</sup>



Obr. 7 1-O-acetylbulbisin

## Homolykorin

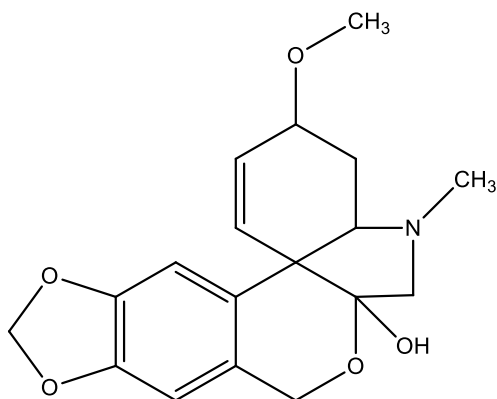
Homolykorin (Obr. 8) je předlohou pro jeden z vedlejších strukturních typů alkaloidů této čeledi.<sup>24</sup> Vyskytuje se v mnoha rostlinách z rodu *Narcissus*.<sup>31</sup> Vykazuje antivirové účinky včetně účinků antiretrovirálních, inhibuje replikaci viru HIV-1.<sup>23</sup> Dále má hypotenzní efekt.<sup>32</sup> Na některé nádorové buňky působí cytotoxicky. Kromě toho vyvolává u zvířat imunopatologickou reakci IV. typu, pozdní přecitlivělost.<sup>31</sup> Odpověď organismu zvířete na homolykorin se vyvíjí s výrazně větším zpožděním než je tomu u alergických reakcí. Hlavní roli mají T – lymfocyty, nikoliv protilátky, jako je tomu u ostatních typů těchto reakcí.<sup>3331</sup>



Obr. 8 Homolykorin

## Tazettin

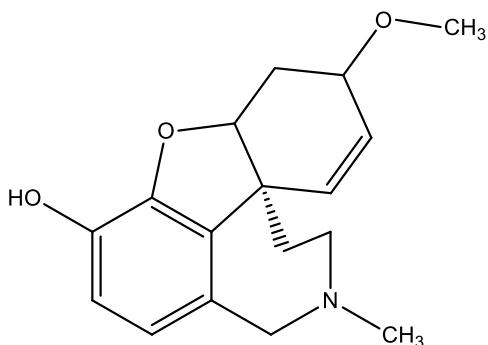
Tazettin (Obr. 9) je strukturní předlohou pro tazettinovou skupinu alkaloidů. Byla u něj prokázána antimalarická aktivita, konkrétně proti *Plasmodium falciparum*.<sup>10</sup> Dále má mírně antiproliferativní a hypotenzní účinky, účinkuje i proti virům.<sup>24 25</sup> Tazettin má také cytotoxické účinky.<sup>32</sup>



Obr. 9 Tazettin

### Chlidanthin

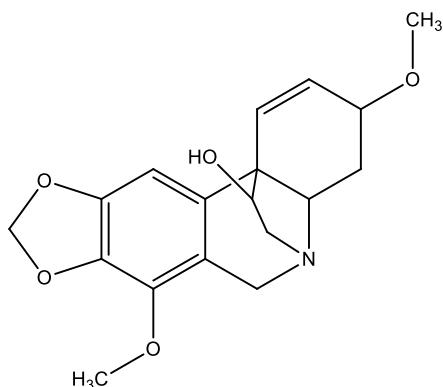
Chlidanthin (Obr. 10) je polohový izomer galanthaminu. Patrně právě díky změnám ve struktuře je jeho inhibiční vliv na AChE pětikrát menší než u galanthaminu. Dále byla testována jeho aktivita proti viru HIV-1, nebyla však prokázána žádná aktivita.<sup>34</sup>



Obr. 10 Chlidanthin

### Ambellin

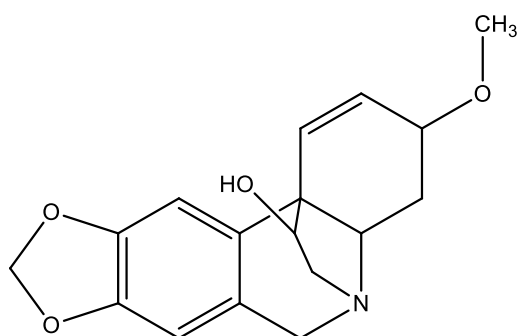
Ambellin (Obr. 11) patří strukturně mezi alkaloidy krininového typu. Je mírným inhibitorem AChE.<sup>23</sup> U ambellinu bylo pozorováno cytotoxické působení na některé lidské nádorové buněčné linie, příkladem může být silná inhibiční aktivita proti lymfatické leukémii.<sup>35</sup> Byly u něj pozorovány i analgetické účinky.<sup>32</sup>



Obr. 11 Ambellin

### **Hemanthamin**

Hemanthamin (Obr. 12) i jeho deriváty vykazuje antiproliferativní aktivitu proti 4 druhům nádorových buněčných linií způsobujícím tumory vaječníku, plic, střev a prsu.<sup>10</sup> Nacházíme u něj i antimalarickou a antivirovou aktivitu.<sup>23 24</sup> Má také analgetické účinky.<sup>32</sup>

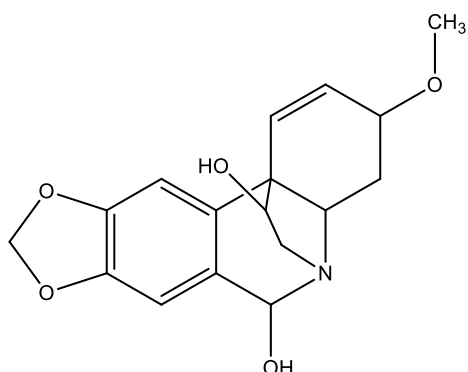


Obr. 12 Hemanthamin

### **Hemanthidin**

Hemanthidin (Obr. 13) a jeho deriváty, stejně jako hemanthamin, vykazují antiproliferativní aktivitu proti 4 druhům nádorových buněčných linií způsobujícím tumory vaječníku, plic, střev a prsu.<sup>10</sup> Stejně tak má jako hemanthamin analgetický účinek.<sup>31</sup> Prokázala se u něj in vitro inhibiční aktivita proti *Trypanosoma brucei rhodesiense* a *Trypanosoma cruzi*. Dále má protizánětlivý účinek, způsobuje inhibici

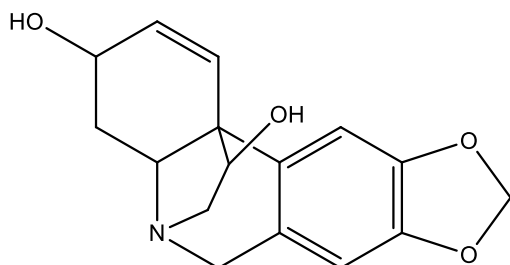
cyklooxygenázy (COX) 1 i 2.<sup>9</sup> Protizánětlivý efekt hemanthidinu je dokonce vyšší než u indometacinu.<sup>36</sup>



Obr. 13 Hemanthidin

### Hamayn

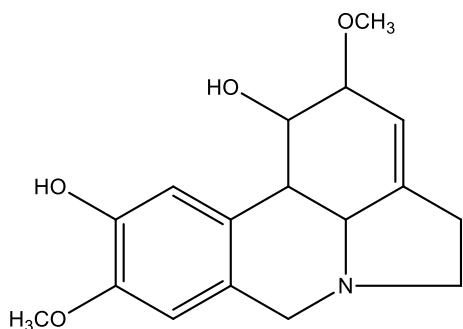
Hamayn (Obr. 14) strukturně řadíme mezi alkaloidy krininového typu.<sup>24</sup> Má mírné cytotoxické vlastnosti, je silným inhibitorem AChE a má mírnou antiplasmodiální aktivitu proti *Plasmodium falciparum*.<sup>23</sup>



Obr. 14 Hamayn

### 9-O-demethylgalanthin

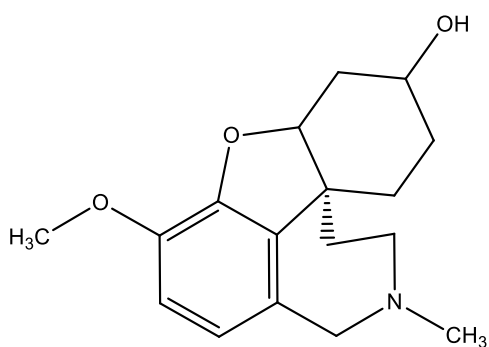
9-O-demethylgalanthin (Obr. 15) je stejně jako undulatin inhibitorem POP. Kromě Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby by mohla léčiva cílená na POP pomoci pacientům trpícím schizofrenií či bipolární afektivní poruchou.<sup>37</sup>



Obr. 15 9-O-demethylgalanthin

### Lykoramin

Lykoramin (Obr. 16), neboli dihydrogalanthamin, je strukturně velice podobný galanthaminu. Je silným reversibilním inhibítorem AChE, byt' o něco slabším než galanthamin. Dá se také použít ke zmírnění symptomů myasthenie gravis a dětské obrny.<sup>38</sup> Při myasthenii gravis nastává obrna svalů, neboť je znemožněn přenos impulzů na nervosvalové ploténce zprostředkovaný acetylcholinem. Dochází k produkci protilátek proti postsynaptickým acetylcholinovým receptorům a jejich následné destrukci. Tento stav pomáhají řešit právě inhibitory AChE.<sup>6</sup>



Obr. 16 Lykoramin



## 8 Experimentální část

### 8.1 Materiál

#### 8.1.1 Použité chemikálie

Použité chemikálie byly získány od firmy Sigma-Aldrich.

Síran železnatý ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )

Chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Ferozin (sodná sůl(4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny)

Hydroxylamin chlorid (HA)

Octan sodný ( $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ )

Kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina)

HEPES sodná sůl

#### 8.1.2 Testované látky

Galanthamin hydrobromid byl zakoupen od firmy Changsha Organic Haerb Inc., China. Všechny ostatní testované látky byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Undulatin, buphanisin, tazettin, chlidanthin, ambellin a 1-O-acetylbulbisin byly vyizolovány z *Chlidanthus fragrans*.<sup>39 40</sup> Hemanthamin, hemanthidin, hamayn, lykoramin a 9-O-demethylgalanthin byly získány ze *Zephyranthes robusta*.<sup>41 42</sup> Homolykorin byl izolován z *Narcissus* Sir W. Churchill.<sup>43</sup> Karanin byl získán z *Nerine bowdenii*.<sup>44</sup> Referenční látka deferoxamin byla zakoupena u firmy Novartis.

### 8.1.3 Příklad

Na měření byl použit spektrofotometr pro čtení mikrotitračních destiček Synergy HT Multi - Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Vermont, U.S.A.).

## 8.2 Metody

### 8.2.1 Příprava zásobních roztoků a roztoků pufrů

Roztok ferozinu - koncentrace 5 mM

- $M_w = 492,5 \text{ g/mol}$
- smísen s vodou do požadované koncentrace

Roztok železnatých iontů – koncentrace 5 mM

- $M_w = 278,02 \text{ g/mol}$
- smísen s vodou do požadované koncentrace
- dále zředěn na 250  $\mu\text{M}$

Roztok železitých iontů – koncentrace 5 mM

- $M_w = 270,3 \text{ g/mol}$
- smísen s vodou do požadované koncentrace
- v čas potřeby zředěn na 250  $\mu\text{M}$

Roztok hydroxylaminu – koncentrace 10 mM

- $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$
- smísen s vodou do požadované koncentrace

Roztoky pufrů pro pH 4,5 a 5,5 – acetátové pufrů

- vodné roztoky octanu sodného a kyseliny octové
- pH bylo upraveno pomocí pH metru

Roztoky pufrů pro pH 6,8 a 7,5 – HEPES pufrů

- vodné roztoky HEPES sodné soli a HEPES kyseliny
- pH bylo upraveno pomocí pH metru

### **8.2.2 Zkouška pro železnaté ionty**

Slouží ke kontrole koncentrace železnatých iontů v připraveném roztoku.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 6,8, 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Fe}^{2+}$  (250  $\mu\text{l}$ ) a 50  $\mu\text{l}$  roztoku ferozinu (5 mM). Poté byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Když se naměřené hodnoty pohybovaly okolo 1.0, roztok obsahoval správnou koncentraci iontů a byl vhodný pro další měření.

### **8.2.3 Zkouška pro železité ionty**

Slouží ke kontrole koncentrace železitých iontů v připraveném roztoku.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 4,5, 50  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného roztoku  $\text{Fe}^{3+}$  (250  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{l}$  HA (10 mM) a 50  $\mu\text{l}$  ferozinu (5 mM). Okamžitě byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Pohybovaly-li se naměřené hodnoty okolo 1.0, obsahoval roztok správnou koncentraci iontů a byl tudíž vhodný pro další měření.

### **8.2.4 Kalibrace železnatých iontů**

Ze zásobního roztoku  $\text{Fe}^{2+}$  byly připraveny roztoky o koncentraci 250  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 0  $\mu\text{M}$ . Pro koncentraci 0  $\mu\text{M}$  (kontrolní) byla použita destilovaná voda. Vždy do 2 jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 6,8, 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Fe}^{2+}$  požadované koncentrace a 50  $\mu\text{l}$  ferozinu (5 mM). Stejný postup byl použit u dalších 2 jamek (slepých), ale místo 50  $\mu\text{l}$  ferozinu bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody. Takto se postupovalo u všech požadovaných koncentrací roztoku  $\text{Fe}^{2+}$ . Poté byla okamžitě změřena absorbance při 562 nm. Z naměřených hodnot byla získána kalibrační křivka, graf závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů.

### **8.2.5 Chelatace železnatých iontů**

Chelatace železnatých iontů byla prováděna 2 způsoby – bez úpravy pH a s úpravou pH pomocí pufrů.

#### **Chelatace bez úpravy pH:**

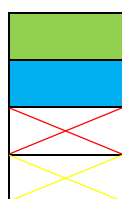
1. Na začátku byly připraveny roztoky chelátorů (alkaloidů) v DMSO o různých koncentracích. U každého chelátoru se jednalo o specifické koncentrace, standardně 10 mM, 1mM a 0,1 mM.
2. Pro každou zkoumanou koncentraci chelátoru byly použity 4 jamky mikrotitrační destičky (Obr. 17), 2 testovací a dvě slepé (bez ferozinu). Dále byly pro jednu sadu měření použity 4 kontrolní jamky, ve kterých nebyl obsažen chelátor. Opět byly 2 testovací a 2 slepé.
3. Do všech jamek kromě kontrolních bylo napipetováno 100  $\mu$ l chelátoru o příslušné koncentraci, v kontrolních jamkách byl nahrazen 100  $\mu$ l DMSO.
4. Dále se do všech jamek napipetovalo 50  $\mu$ l roztoku  $\text{Fe}^{2+}$  (250  $\mu$ M).
5. Mikrotitrační destička se nechala 2 minuty třepat na třepačce.
6. Do všech testovacích jamek bylo napipetováno 50  $\mu$ l ferozinu, do slepých jamek 50  $\mu$ l destilované vody.
7. Okamžitě se změřila absorbance při 562 nm.
8. Měření se zopakovalo za 5 minut, start měření byl za 4 minuty a 30 sekund.

#### **Chelatace s úpravou pH:**

1. Na začátku byly připraveny roztoky chelátorů (alkaloidů) v DMSO o různých koncentracích. U každého chelátoru se jednalo o specifické koncentrace, standardně 25 mM, 10 mM, 1mM a 0,1 mM.

2. Pro každou zkoumanou koncentraci chelátoru byly použity 4 jamky, 2 testovací a dvě slepé (bez ferozinu). Dále byly pro jednu sadu měření použity 4 kontrolní jamky. Opět byly 2 testovací a 2 slepé.
3. Do všech jamek bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o příslušném pH (4,5, 5,5, 6,8, 7,5).
4. Dále bylo do všech jamek napipetováno 50  $\mu\text{l}$  chelátoru o příslušné koncentraci, v kontrolních jamkách byl chelátor nahrazen 50  $\mu\text{l}$  DMSO. Pro měření při pH 7,5 bylo do všech jamek přidáno 50  $\mu\text{l}$  HA.
5. Poté bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Fe}^{2+}$  (250  $\mu\text{M}$ ).
6. Destička byla vložena na 2 minuty do třepačky.
7. Do testovacích jamek bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku ferozinu, do slepých jamek 50  $\mu\text{l}$  destilované vody.
8. Ihned byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
9. Po 5 minutách bylo měření opakováno, start měření byl po 4 minutách a 30 sekundách.

Koncentrace testovaného roztoku (mM)	25	10	1	0,1	0
Absorbance s ferozinem					
Absorbance s ferozinem					
Absorbance s vodou					
Absorbance s vodou					



- Testovací jamky - roztok chelátoru
- Kontrolní jamky – roztok příslušného rozpouštědla
- Jamky s roztokem ferozinu
- Slepé jamky – jamky s vodou

Obr. 17 Schéma rozložení na mikrotitrační destičce

### 8.2.6 Chelatace $\text{Fe}^{2+/3+}$ iontů

1. Na začátku byly připraveny roztoky chelátorů (alkaloidů) v DMSO o různých koncentracích. U každého chelátoru se jednalo o specifické koncentrace, standardně 10 mM, 1mM a 0,1 mM.
2. Pro každou zkoumanou koncentraci chelátoru byly použity 4 jamky, 2 testovací a dvě slepé (bez ferozinu). Dále byly pro jednu sadu měření použity 4 kontrolní jamky, ve kterých nebyl obsažen chelátor. Opět byly 2 testovací a 2 slepé.
3. Do všech jamek se napipetovalo 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 4,5.

4. Dále bylo do všech jamek napipetováno 50  $\mu\text{l}$  roztoku chelátoru o požadované koncentraci, v kontrolních jamkách bylo nahrazeno 50  $\mu\text{l}$  DMSO.
5. Poté se čerstvě naředil zásobní roztok  $\text{Fe}^{3+}$  iontů na koncentraci 250  $\mu\text{M}$ .
6. Do všech jamek se přidalo 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Fe}^{3+}$  iontů.
7. Destička se umístila na 2 minuty do třepačky.
8. Následně se do všech jamek přidalo 50  $\mu\text{l}$  HA.
9. Destička byla vložena na 1 minutu do třepačky.
10. Přidalo se 50  $\mu\text{l}$  roztoku ferozinu do testovacích jamek a 50  $\mu\text{l}$  destilované vody do slepých jamek.
11. Okamžitě byla měřena absorbance při 562 nm.
12. Měření se zopakovalo za 5 minut, start byl za 4 minuty a 30 sekund.

### **8.2.7 Redukce železitých iontů**

1. Na začátku byly připraveny roztoky chelátorů (alkaloidů) v DMSO o různých koncentracích. U každého chelátoru se jednalo o specifické koncentrace, standardně 10 mM, 1mM, 0,1 a 0 mM.
2. Pro každou zkoumanou koncentraci chelátoru byly použity 4 jamky, 2 testovací a dvě slepé (bez ferozinu). Dále byly pro jednu sadu měření použity 4 kontrolní jamky. Opět byly 2 testovací a 2 slepé.
3. Do všech jamek kromě kontrolních se napipetovalo 150  $\mu\text{l}$  požadovaného pufru. Do kontrolních jamek bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 4,5.
4. Poté bylo do testovacích přidáno 50  $\mu\text{l}$  chelátoru o požadované koncentraci. Pro koncentraci 0 mM bylo použito 50  $\mu\text{l}$  DMSO. V kontrolních jamkách byl nahrazen 50  $\mu\text{l}$  HA.

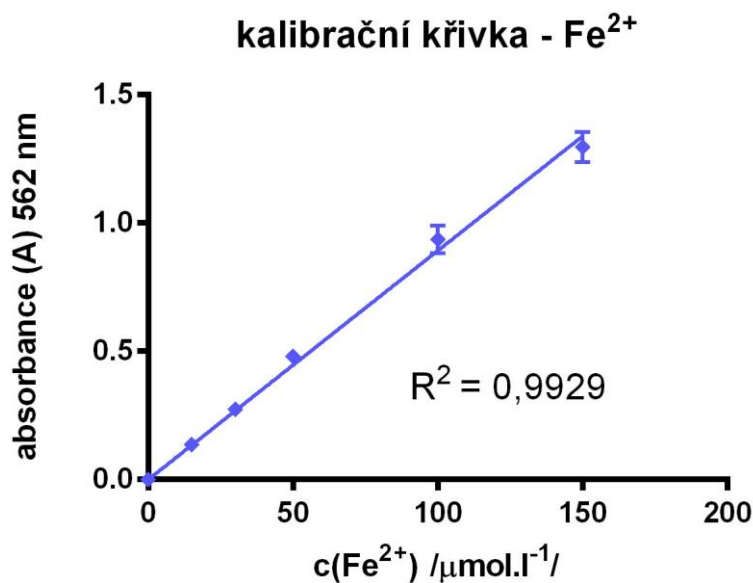
5. Poté se čerstvě naředil zásobní roztok  $\text{Fe}^{3+}$  iontů na koncentraci  $250 \mu\text{M}$ .
6. Do všech jamek se přidalo  $50 \mu\text{l}$  roztoku  $\text{Fe}^{3+}$  iontů.
7. Pak se destička nechala 2 minuty třepat v třepačce.
8. Do testovacích jamek se přidalo  $50 \mu\text{l}$  ferozinu, do slepých jamek  $50 \mu\text{l}$  destilované vody.
9. Okamžitě se změřila absorbance při  $562 \text{ nm}$ .
10. Měření se zopakovalo za 5 minut, start měření byl za 4 minuty a 30 sekund.



## 9 Výsledky

### 9.1 Kalibrační křivka železnatých iontů

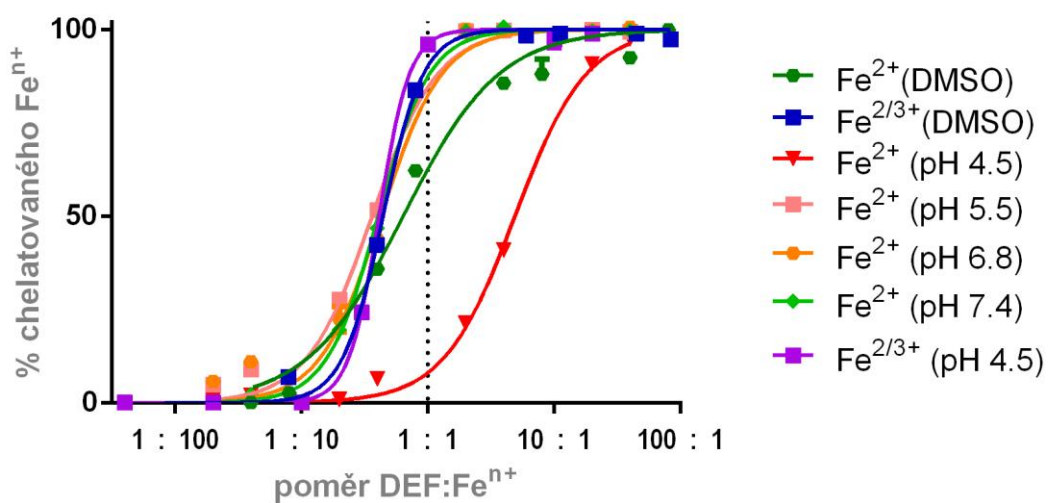
Na základě naměřených hodnot byl sestaven graf (Obr. 18) závislosti absorbance na koncentraci železa. Z grafu vyplývá, že se jedná o závislost lineární.



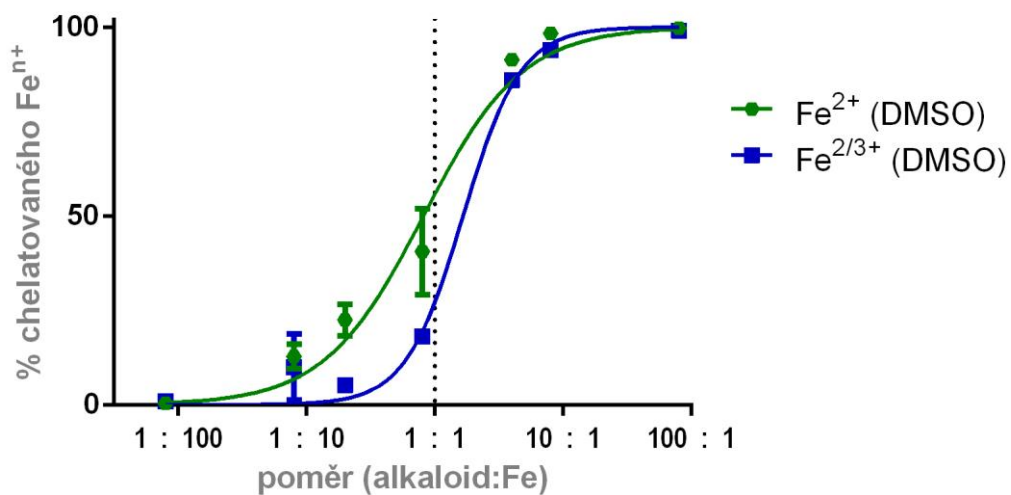
Obr. 18 Kalibrační křivka Fe<sup>2+</sup>

### 9.2 Chelatační aktivita jednotlivých alkaloidů

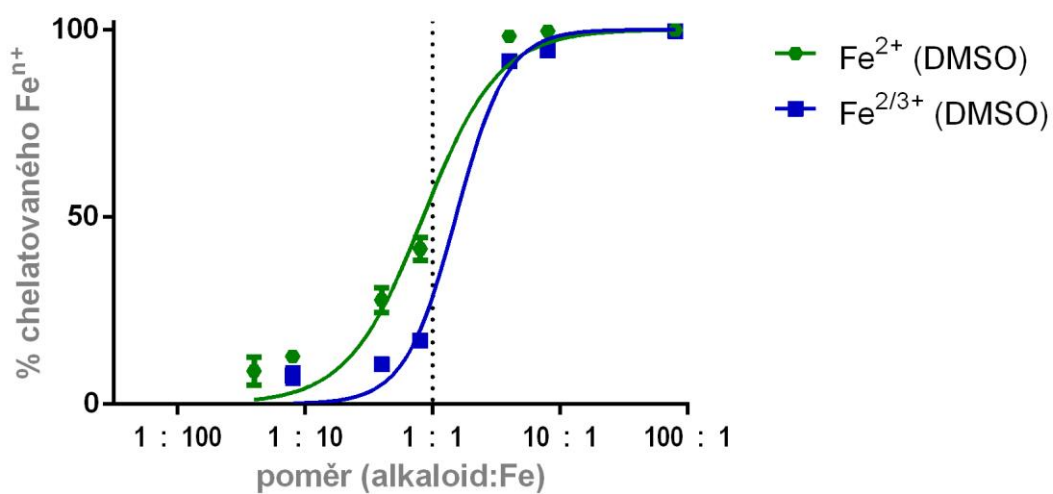
Z naměřených hodnot chelatační aktivity byly sestaveny grafy (Obr. 20 – 32). Galanthamin nevykázal žádnou chelatační aktivitu, graf tedy nemohl být sestaven. Aktivita měřených alkaloidů byla porovnávána s aktivitou referenční látky - deferoxaminu, jehož graf (Obr. 19) je rovněž přiložen.



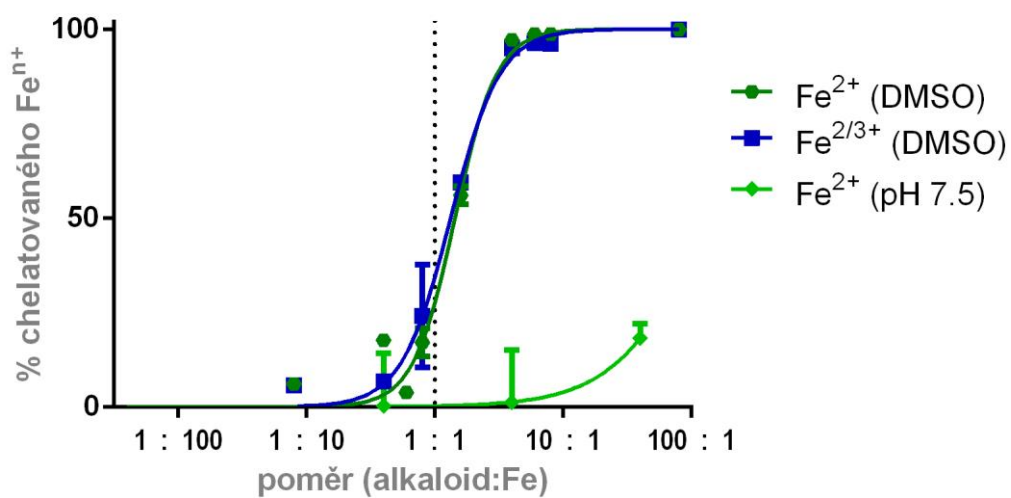
Obr. 19 Chelatační aktivita deferoxaminu v závislosti na poměru chelátoru a železa



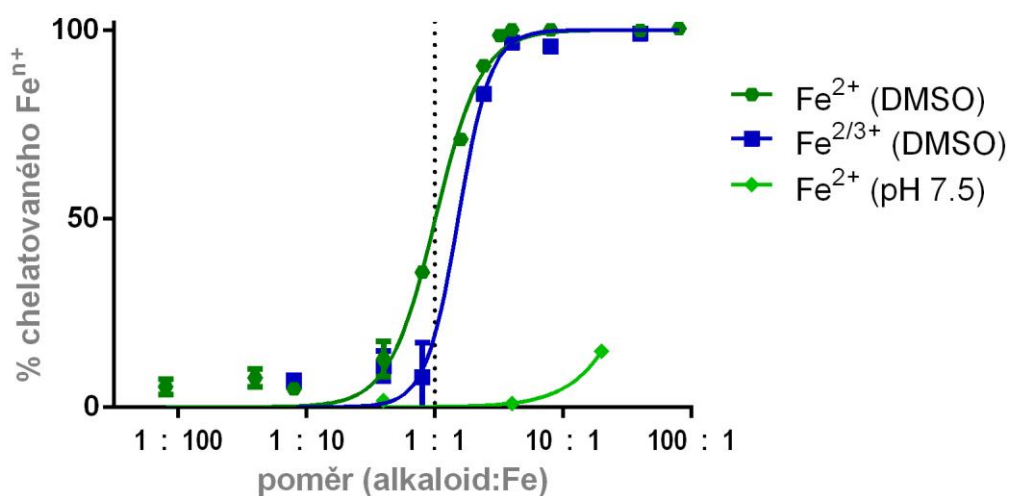
Obr. 20 Chelatační aktivita undulatinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



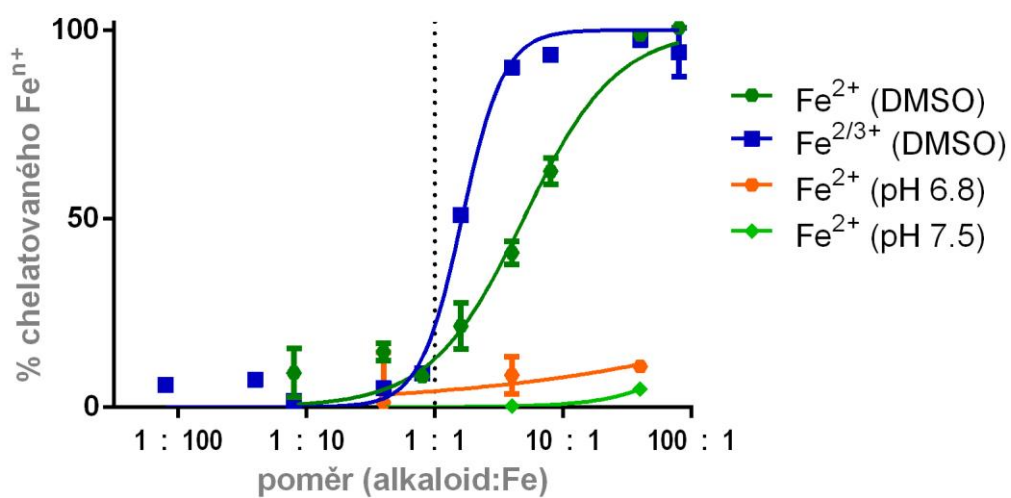
Obr. 21 Chelatační aktivita buphanisinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



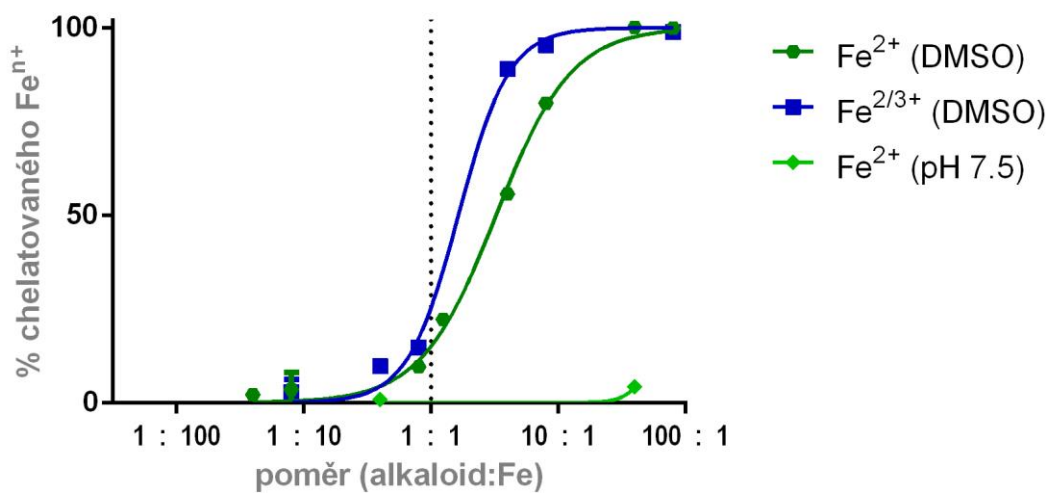
Obr. 22 Chelatační aktivita karaninu v závislosti na poměru chelátoru a železa



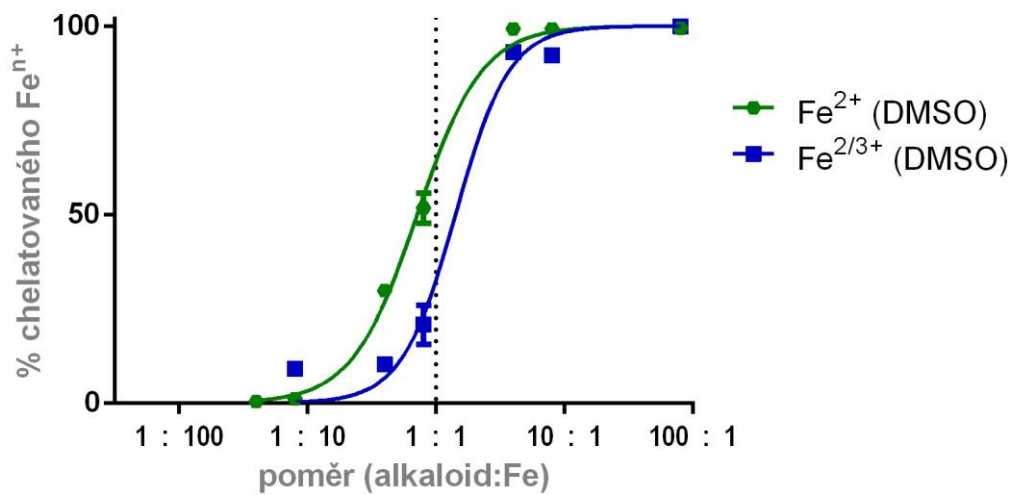
Obr. 23 Chelatační aktivita 1-O-acetylbubisinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



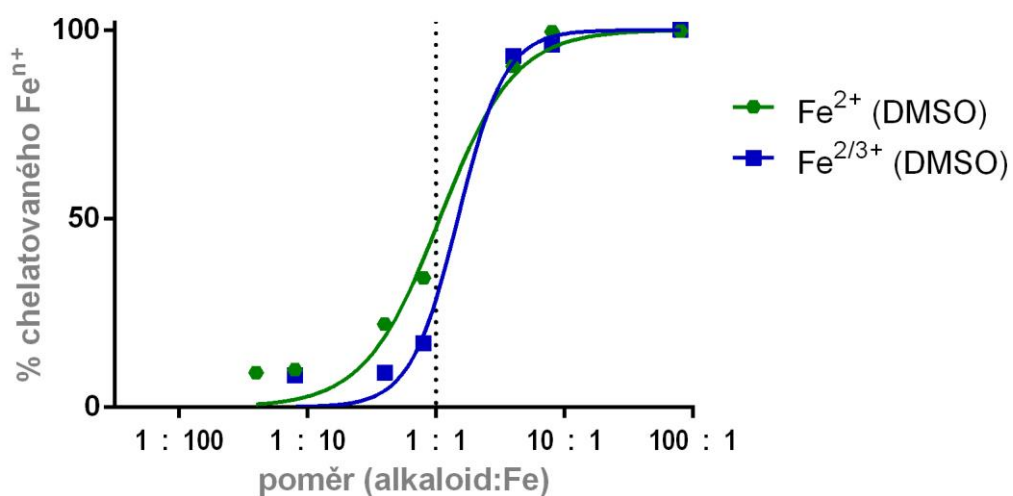
Obr. 24 Chelatační aktivita homolykorinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



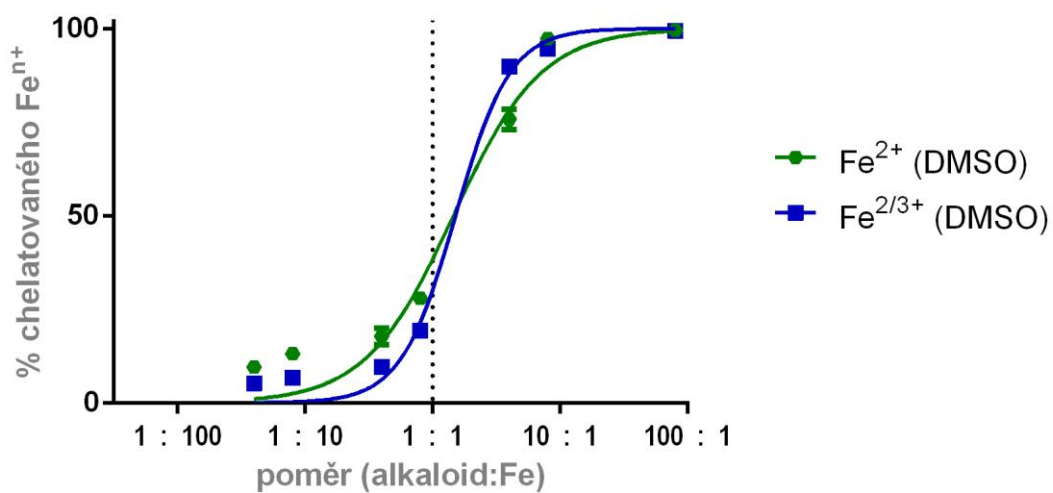
Obr. 25 Chelatační aktivita tazettinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



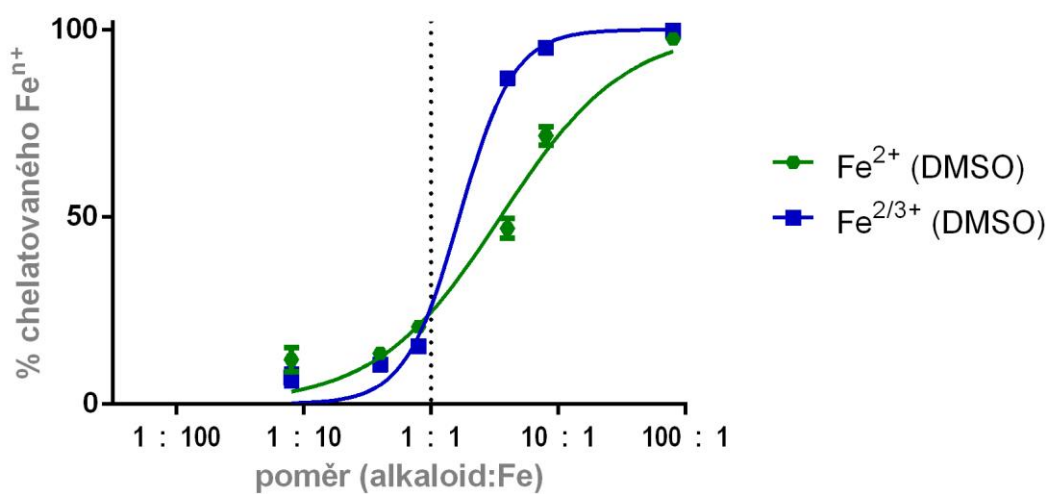
Obr. 26 Chelatační aktivita chlindanthinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



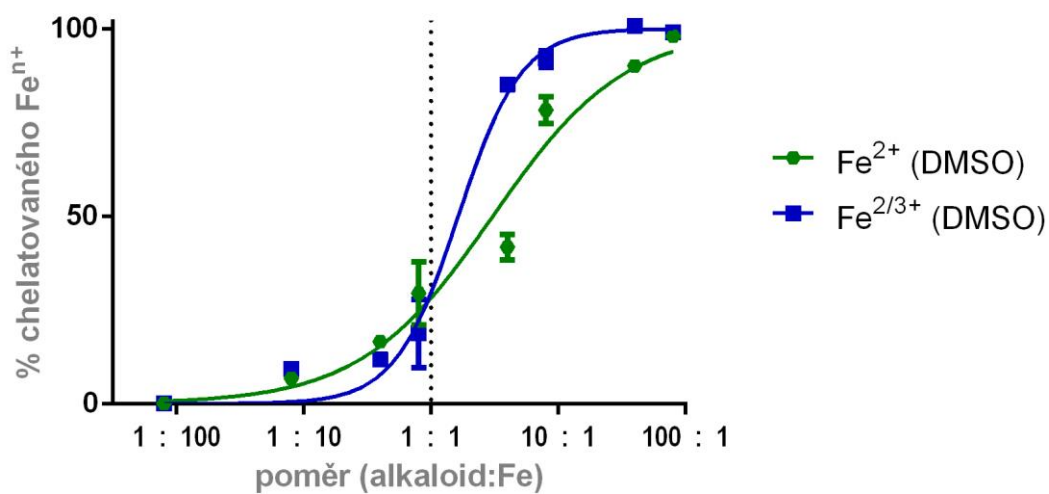
Obr. 27 Chelatační aktivita ambellinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



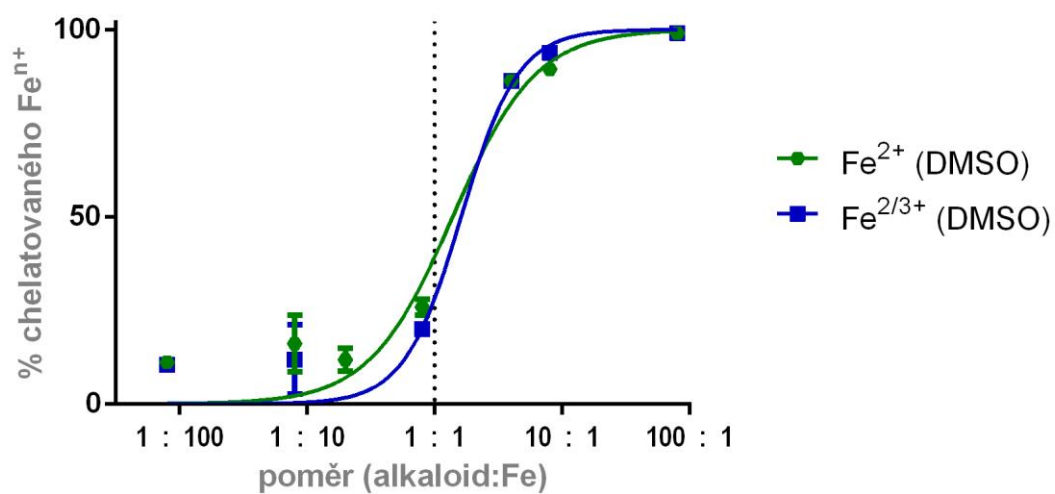
Obr. 28 Chelatační aktivita hemanthaminu v závislosti na poměru chelátoru a železa



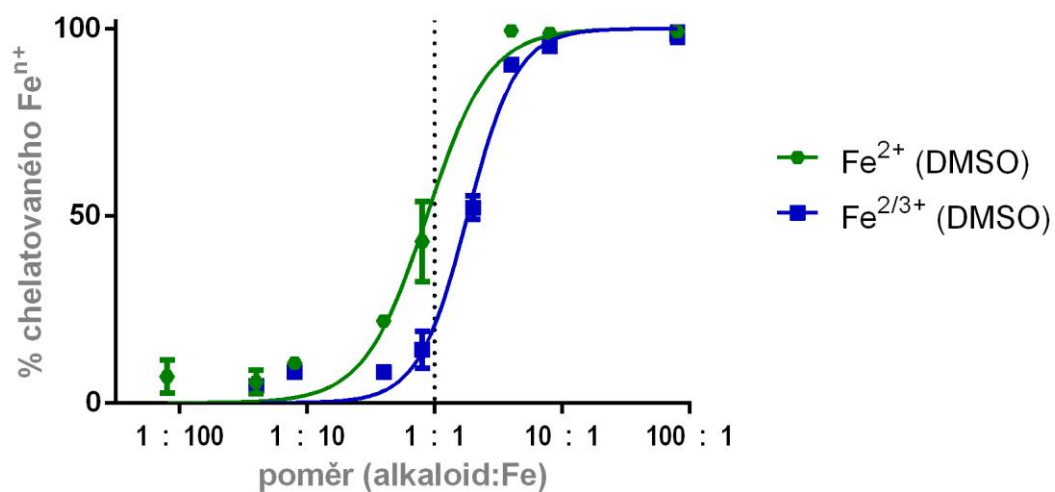
Obr. 29 Chelatační aktivita hemanthidinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



Obr. 30 Chelatační aktivita hamaynu v závislosti na poměru chelátoru a železa



Obr. 31 Chelatační aktivita 1-O-demethylgalanthinu v závislosti na poměru chelátoru a železa



Obr. 32 Chelatační aktivita lykoraminu v závislosti na poměru chelátoru a železa

### 9.3 Redukční aktivita jednotlivých alkaloidů

Žádný z alkaloidů nevykázal redukční aktivitu, graf tedy nemohl být sestaven.



## 10 Diskuze

Alkaloidy jsou početnou skupinou sekundárních metabolitů rostlin. Zatím bylo identifikováno přes 3 000 typů alkaloidů ve více než 4 000 rostlinných druzích. Jejich účinky zatím nejsou příliš prozkoumané a ve farmaceutickém výzkumu jsou často opomíjené, neboť mnoho z nich má silně toxické účinky na organismus.<sup>45</sup>

Pro měření železo-chelatační aktivity byla použita metoda mikrotitrace s detekcí pomocí spektrofotometru. Jako indikátor sloužil ferozin, který má vysoký extinkční koeficient při 562 nm. Ferozin vytvořil barevný komplex s ionty  $\text{Fe}^{2+}$ , které se nepodílely na chelataci s testovaným alkaloidem. Takto vzniklý barevný komplex se pak spektrofotometricky detekoval. Ferozin je schopný tvořit komplexy pouze s ionty  $\text{Fe}^{2+}$ , proto musely být ionty  $\text{Fe}^{3+}$  před měřením celkového železa zredukovány na ionty  $\text{Fe}^{2+}$  pomocí redukčního činidla hydroxylaminu. Linearita závislosti absorbance na koncentraci iontů  $\text{Fe}^{2+}$  byla ověřena pomocí kalibrační křivky (Obr. 18) s vysokou hodnotou spolehlivosti ( $R^2=0,9929$ ).

Porovnání aktivity jednotlivých alkaloidů bylo provedeno při koncentracích alkaloid:Fe 1:1 (dále jen „poměr 1:1“) a alkaloid:Fe 10:1 (dále jen „poměr 10:1“). Všechny alkaloidy byly kromě ve standardním prostředí proměřeny také při vybraných hodnotách pH v prostředí příslušných pufrů.

Při chelataci iontů  $\text{Fe}^{2+}$  v poměru 10:1 vykazovaly alkaloidy undulatin, buphanisin, karanin, 1-O-acetylbulbisin, chlidanthin, ambellin, hemanthamin, 9-O-demethylgalanthin a lykoramin obdobnou aktivitu srovnatelnou s aktivitou deferoxaminu. Tyto alkaloidy vykazovaly vysokou chelatační aktivitu blížíci se k 100 %. Alkaloidy homolykorin, tazettin, hemanthidin a hamayn prokázaly nižší aktivitu.

Při poměru 1:1 byly dosažené hodnoty výrazně nižší. Referenční deferoxamin vykazoval nejvyšší aktivitu. Z alkaloidů se mu nejvíce přiblížil chlidanthin, obdobných hodnot (okolo 50%) dosáhly i buphanisin, undulatin, lykoramin, ambellin

a 1-O-acetylbulbisin, blížily se i hemanthamin a 9-O-demethylgalanthin. Naopak velice nízkou aktivitu vykázaly tazettin a homolykorin.

Chelatace celkového železa v poměru 10:1 přinesla trochu jiné výsledky, všechny látky vykázaly vysokou aktivitu blížící se k 100%. Deferoxamin vykazoval 100 %.

Při poměru 1:1 byla chelatace celkového železa u všech alkaloidů oproti deferoxaminu (téměř 100%) velice nízká, pohybovala se hluboko pod 50%. Nejnižší aktivita byla změřena u 1-O-acetylbulbisinu a homolykorinu.

U zkoumaných látek byla měřena též železo-chelatační aktivita při upraveném pH. Ve všech případech nebyla naměřena žádná aktivita nebo jen velice nízká aktivita i při vysokých koncentracích chelátoru v poměru k železu. Deferoxamin vykazoval velice dobré výsledky při všech měřených pH kromě pH 4,5, při kterém byla jeho aktivita v nižších koncentracích také nízká.

Redukční aktivitu nevykazoval žádný z měřených alkaloidů. Žádný z nich tedy nemůže redukovat ionty  $Fe^{3+}$  na ionty  $Fe^{2+}$  a tudíž nemůže zvyšovat množství katalyzátorů Fentonovy reakce.<sup>8</sup>

Na základě provedeného měření můžeme konstatovat, že žádná z testovaných látek nemá lepší železo-chelatační schopnosti než deferoxamin. Rozdíly byly vidět především v nižších koncentracích. Při poměru 10:1 při měření celkového železa i iontů  $Fe^{2+}$  byla chelatační aktivita u většiny zkoumaných alkaloidů vysoká, srovnatelná s deferoxaminem. Při snižování koncentrace alkaloidů aktivita prudce klesala, při poměru 1:1 při stanovení celkového železa už byla u všech alkaloidů velice nízká, zajímavější aktivitu alkaloidy ukázaly za poměru 1:1 při chelataci iontů  $Fe^{2+}$ . Zde se slibně projeví především chlidanthin, buphanisin, undulatin, ambellin a 1-O-acetylbulbisin. Oproti deferoxaminu byla jejich aktivita ale stále nižší. Z provedených měření je dále patrné, že je železo-chelatační účinek alkaloidů závislý na jejich koncentraci. Můžeme také usuzovat, že pro případné terapeutické použití by bylo potřeba dosáhnout koncentrací alkaloidů blížících se poměru 10:1 k iontům železa. Je však otázkou, jestli by mohlo být terapeutické použití některého

z alkaloidů vhodnější než použití současně užívaného deferoxaminu. Alkaloidy obecně mají potenciál způsobovat řadu nežádoucích účinků na lidský organismus a užívat je ve vysokých koncentracích nebývá žádoucí. Toto téma by bylo ještě nutné velmi důkladně prostudovat.

Zkoumání vztahů mezi strukturou a účinkem není při malém souboru vzorku snadné, proto je možné, že se závěry vyvozené v této diplomové práci nemusí shodovat s novými poznatky, které v budoucnu vzniknou. V současné době nejsou publikovány vhodné studie k porovnání výsledků a závěrů této práce.

Pro železo-chelatační účinek je nutné, aby látka ve své struktuře obsahovala dusík a kyslík s volnými elektronovými páry. Pro aktivitu molekuly jsou tedy pravděpodobně výhodné hydroxy- (-OH) a methoxysubstituenty (-OCH<sub>3</sub>). Dusík obsažený ve všech testovaných látkách byl terciární, tedy s jedním volným elektronovým párem. Dále se zdá, že je-li dusík alkaloidu součástí 5 členného heterocyklu s navázaným methylovým substituentem, aktivita se významně snižuje. Pro aktivitu se jeví výhodná acetylová skupina navázaná na základní skelet přes kyslík, pravděpodobně díky volným elektronovým párům obsažených atomů kyslíku. U alkaloidů galanthaminové struktury způsobuje umístění -OH skupiny v poloze 3 v sousedství s dvojnou vazbou v poloze 4 úplnou ztrátu chelatačního účinku (galanthamin), hydrogenací kruhu (lykoramin) nebo nahrazením -OH skupiny skupinou -OCH<sub>3</sub> (chlidanthin) vznikají molekuly s dobrými chelatačními schopnostmi.

## 11 Závěr

Tato diplomová práce popisuje železo-chelatační aktivitu vybraných alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae (galanthamin, undulatin, buphanisin, karantin, 1-O-acetylbulbisin, homolykorin, tazettin, chlidanthin, ambellin, hemanthamin, hemanthidin, hamayn, 9-O-demethylgalanthin, lykoramin). Jako standard pro srovnání aktivity byl vybrán deferoxamin, klinicky využívaný chelátor železa. Zjistilo se, že míra chelatační aktivity alkaloidů je ovlivněna jejich koncentrací. Porovnávala se schopnost alkaloidů a deferoxaminu chelatovat ionty  $Fe^{2+}$  a celkové železo při poměrech 10:1 a 1:1. Ve všech případech byl neúčinnějším chelátorem deferoxamin. V koncentraci 10:1 dosahovaly podobných výsledků jako deferoxamin i měřené alkaloidy, s poklesem jejich koncentrace však prudce klesala i jejich aktivita. Při koncentraci 1:1 byla jejich schopnost chelatovat celkové železo výrazně nižší než u deferoxaminu. Při chelataci iontů  $Fe^{2+}$  v poměru 1:1 dosahovaly některé z alkaloidů podobných hodnot jako deferoxamin. Dobré výsledky byly pozorovány u chlidanthinu, buphanisinu, undulatinu či lykoraminu. Aktivita byla také měřena s upraveným pH, žádný z alkaloidů však nevykázal jakkoliv významnou aktivitu. Aktivní byl pouze deferoxamin. Galanthamin vykázal při všech měřeních nulovou aktivitu. Redukční aktivita nebyla naměřena u žádného z alkaloidů.

Výsledky měření nemohly být porovnány s jinými publikovanými výsledky, neboť pro zkoumané alkaloidy nejsou v současné době žádné k dispozici.

## 12 Seznam zkratek

AChE - acetylcholinesteráza

COX – cyklooxygenáza

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – kyselina deoxyribonukleová

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

GIT – gastrointestinální trakt

HA – hydroxylamin chlorid

HEB – hematoencefalická bariéra

HFE – human hemochromatosis protein

$M_w$  – molekulová hmotnost

$Na_2CaEDTA$  – edetan vápenato-disodný

NÚ – nežádoucí účinky

$OCH_3$ - - methoxy

OH- - hydroxy

POP – prolyl oligopeptidáza

RES – retikuloendotelový systém

ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku

## 13 Použitá literatura

<sup>1</sup> LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0850-2.

<sup>2</sup> TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

<sup>3</sup> ROKYTA, Richard. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Vyd. 1. Praha: ISV, 2000, 359 s. Lékařství. ISBN 80-858-6645-5.

<sup>4</sup> MASOPUST, Jaroslav a Richard PRŮŠA. *Patobiochemie metabolických drah*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 1999. ISBN 80-238-4589-6.

<sup>5</sup> HORÁK, Jiří. *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3287-9.

<sup>6</sup> SILBERNAGL, Stefan a Florian LANG. *Atlas patofyziologie člověka*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2001, xiii, 390 s. ISBN 80-716-9968-3.

<sup>7</sup> LIU, Zu D. a Robert C. HIDER. *Design of clinically useful iron(III)-selective chelators* [online]. [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1002/med.1027. ISBN 10.1002/med.1027. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.1027>

<sup>8</sup> MACÁKOVÁ K., MLADĚNKA P., FILIPSKÝ T., ŘÍHA M., Jahodář L., TREJTNAR F., BOVICELLI P., PROIETTI SILVESTRI I., HRDINA R., SASO L. *Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.107. ISBN 10.1016/j.foodchem.2012.06.107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612011089>

<sup>9</sup> NAIR, Jerald J. a Johannes VAN STADEN. *Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae* [online]. [cit. 2016-02-12]. DOI: 10.1016/j.fct.2013.08.042. ISBN 10.1016/j.fct.2013.08.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691513005887>

<sup>10</sup> CEDRÓN, Juan, Ángel RAVELO, Leticia LEÓN, José PADRÓN a Ana ESTÉVEZ-BRAUN. *Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids* [online]. [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.3390/molecules200813854. ISBN 10.3390/molecules200813854. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/8/13854/>

<sup>11</sup> Mikro-verze AISLP – Automatizovaný Informační Systém Léčivých Přípravků [cit. 2016-01-24]

<sup>12</sup> Metabolismus železa. *Anemie-chudokrevnost.cz* [online]. Vifor Pharma, 2011 [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: <http://anemie-chudokrevnost.cz/metabolismus-zeleza>

<sup>13</sup> BUREŠ, Jan, Jiří HORÁČEK a Jaroslav MALÝ. *Vnitřní lékařství. 2.*, přeprac. a rozš. vyd. Praha: Galén, c2014. ISBN 978-80-7492-145-2.

<sup>14</sup> Kudláčková, Zdeňka. *Klasifikace a příčiny anémií. Poruchy hemokoagulace*. Hradec Králové: materiály Katedry biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta UK, 2015.

<sup>15</sup> O'MALLEY, Gerald F. a Rika O'MALLEY. *Iron Poisoning*. In: *Merck Manuals* [online]. Kenilworth, NJ, USA: Merck Sharp & Dohme, 2015 [cit. 2016-01-10]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/injuries;-poisoning/poisoning/iron-poisoning>

<sup>16</sup> JONÁŠOVÁ, Anna. Přetížení železem u chronicky transfundovaných nemocných a jeho terapie. *Postgraduální medicína* [online]. 2012, **2012**(08), 8 [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/pretizeni-zelezem-u-chronicky-transfundovanych-nemocnych-a-jeho-terapie-467140>

<sup>17</sup> KAUFFMAN, George B. Coordinating compound. *Encyclopædia Britannica* [online]. **2016** [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/coordination-compound>

- <sup>18</sup> LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
- <sup>19</sup> TAHER, Ali, Antoine N. SALIBA a Afif HARB. *Iron chelation therapy in transfusion-dependent thalassemia patients: current strategies and future directions* [online]. [cit. 2016-01-25]. DOI: 10.2147/JBM.S72463. ISBN 10.2147/JBM.S72463. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/iron-chelation-therapy-in-transfusion-dependent-thalassemia-patients-c-peer-reviewed-article-JBM>
- <sup>20</sup> Exjade. In: *European medicines agency* [online]. 30 Churchill Place, London, UK: EMA, 2015 [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000670/human\\_med\\_000780.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000670/human_med_000780.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)
- <sup>21</sup> JAHODÁŘ, Luděk. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 3., upr. a dopl. Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
- <sup>22</sup> ČERVINKA, Otakar, Václav DĚDEK a Miloslav FERLES. *Organická chemie*. 4. vyd., V Informatoriu 1. Praha: Informatorium, 1991, 791 s. ISBN 80-85427-03-6.
- <sup>23</sup> BUKOVÁ, Vladimíra. *Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita (1960-2010)*. Diplomová práce. 2011. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 77 s.
- <sup>24</sup> NAIR, Jerald J. a Johannes VAN STADEN. *Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the South African medicinal plant Boophone disticha (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae)* [online]. [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1016/j.jep.2013.10.053. ISBN 10.1016/j.jep.2013.10.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874113007782>



- <sup>25</sup> Salehi Sourmaghi MH, Azadi B, Amin G, Amini M, Sharifzadeh M. The first phytochemical report of *Galanthus transcaucasicus* Fomin. *DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2010;18(2):124-127.
- <sup>26</sup> CIBIČKOVÁ, Lubica a Vladimír PALIČKA. Galantamin v terapii Alzheimerovy demence. *Česká geriatrická revue*[online]. 2005, **2005**(2) [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: [http://www.geriatrickarevue.cz/pdf/gr\\_05\\_02\\_05.pdf](http://www.geriatrickarevue.cz/pdf/gr_05_02_05.pdf)
- <sup>27</sup> JIRÁK, Roman. GALANTAMIN A JEHO ÚLOHA V LÉČBĚ KOGNITIVNÍCH FUNKCÍ. *Česká a Slovenská Psychiatrie*[online]. 2015, **111**(3), 127-131 [cit. 2016-02-12]. ISSN 12120383. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&an=108567827&scope=sit>  
e
- <sup>28</sup> CAHLÍKOVÁ, Lucie, Daniel I. PÉREZ, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Jakub CHLEBEK, Marcela ŠAFRATOVÁ, Anna HOŠTÁLKOVÁ a Lubomír OPLETAL. *In Vitro Inhibitory Effects of 8- O - Demethylmaritidine and Undulatine on Acetylcholinesterase and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier* [online]. [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00191. ISBN 10.1021/acs.jnatprod.5b00191. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.5b00191>
- <sup>29</sup> JALKANEN, Aaro J., Jenni J. HAKKARAINEN, Marko LEHTONEN, Tetta VENÄLÄINEN, Tiina M. KÄÄRIÄINEN, Elina JARHO, Marjukka SUHONEN a Markus M. FORSBERG. *Brain Pharmacokinetics of Two Prolyl Oligopeptidase Inhibitors, JTP-4819 and KYP-2047, in the Rat* [online]. [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00747.x. ISBN 10.1111/j.1742-7843.2011.00747.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-7843.2011.00747.x>
- <sup>30</sup> REFAAT, John, Mohamed S. KAMEL, Mahmoud A. RAMADAN a Ahmed A. ALI. Crinum; an endless source of bioactive principles: a review, part II. Crinum alkaloids: Crinine - type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online].

2012, **2012**(3(9), 3091-3100 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: <http://ijpsr.com/bft-article/crinum-an-endless-source-of-bioactive-principles-a-review-part-ii-crinum-alkaloids-crinine-type-alkaloids/>

<sup>31</sup> LABRANA, J., G. CHOY, X. SOLANS, M. FONT-BARDIA, G. de la. FUENTE, F. VILADOMAT, C. CODINA a J. BASTIDA. Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* [online]. 1999, **50**(1) [cit. 2016-03-07]. ISSN 00319422. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsagr&an=edsagr.US201302894719&scope=site>

<sup>32</sup> NAIR, Jerald J. a Johannes VAN STADEN. *Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae* [online]. [cit. 2016-03-07]. DOI: 10.1016/j.fct.2013.08.042. ISBN 10.1016/j.fct.2013.08.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691513005887>

<sup>33</sup> JÍLEK, Petr. *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3.

<sup>34</sup> REYES-CHILPA R., BERKOV S., HERNÁNDEZ-ORTEGA S., JANKOWSKI CH., ARSENEAU S., CLOTET-CODINA I., ESTE J., CODINA C., VILADOMAT F., BASTIDA J. *Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from Zephyranthes concolor* [online]. [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.3390/molecules16119520. ISBN 10.3390/molecules16119520. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/11/9520/>

<sup>35</sup> BERKOV, Strahil, Stefania ROMANI, Maria HERRERA, Francesc VILADOMAT, Carles CODINA, Georgi MOMEKOV, Iliana IONKOVA a Jaume BASTIDA. *Antiproliferative Alkaloids from Crinum zeylanicum* [online]. [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1002/ptr.3468. ISBN 10.1002/ptr.3468. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.3468>

- <sup>36</sup> Çitoğlu, G., Tanker, M. and Gümüşel, B. (1998), *Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine*. *Phytother. Res.*, 12: 205–206. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<205::AID-PTR203>3.0.CO;2-7
- <sup>37</sup> CAHLÍKOVÁ L., HULOVÁ L., HRABINOVÁ M., CHLEBEK J., HOŠŤÁLKOVÁ A., ADAMCOVÁ M., ŠAFRATOVÁ M., JUN D., OPLETAL L., LOČÁREK M., MACÁKOVÁ K. *Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors* [online]. [cit. 2016-03-07]. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.04.004. ISBN 10.1016/j.fitote.2015.04.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X15000945>
- <sup>38</sup> XIANG, Qiuyue, Ying CHEN a Zilin CHEN. *Sensitive and simultaneous determination of active components in Lycoris radiata and rat plasma by HPLC with fluorescence detection* [online]. [cit. 2016-03-08]. DOI: 10.1039/c4ay01793e. ISBN 10.1039/C4AY01793E. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AY01793E>
- <sup>39</sup> CAHLÍKOVÁ L., MACÁKOVÁ K., ZAVADIL S., JIROŠ P., OPLETAL L., URBANOVÁ K., JAHODÁŘ L. (2011) *Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Chlidanthus fragrans by GC-MS and their cholinesterase activity*. *Nat Prod Commun*, 6(5), 603-606.
- <sup>40</sup> DOSKOČIL I., HOŠŤÁLKOVÁ A., ŠAFRATOVÁ M., BENEŠOVÁ N., HAVLÍK J., HAVELEK R., KUNEŠ J., KRÁLOVEC K., CHLEBEK J., CAHLÍKOVÁ L. *Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells* [online]. [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.08.004. ISBN 10.1016/j.phytol.2015.08.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439001530046X>
- <sup>41</sup> ŠAFRATOVÁ M., NOVÁK Z., KULHÁNKOVÁ A., KUNEŠ J., HRABINOVÁ M., JUN D., MACÁKOVÁ K., OPLETAL L., CAHLÍKOVÁ K. (2014) *Revised NMR Data for 9-O-demethylgalanthine : an Alkaloid from Zephyranthes robusta (Amaryllidaceae) and its Biological Activity*. *Nat. Prod. Commun.*, 9(6), 787-788.

<sup>42</sup> CAHLÍKOVÁ L., KULHÁNKOVÁ A., URBANOVÁ K., VALTEROVÁ I., MACÁKOVÁ K., KUNEŠ J. (2010) *Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Zephyranthes robusta by GC-MS and their cholinesterase activity. Nat. Prod. Commun.*, **5**(8),1201-1204.

<sup>43</sup> CAHLÍKOVÁ L., LOČÁREK M., BENEŠOVÁ N., KUČERA R., CHLEBEK J., NOVÁK Z., OPLETAL L.

*Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of Narcissus Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. Nat. Prod. Commun.*, 2013, 8(6), 781-785.

<sup>44</sup> VANĚČKOVÁ N., HOŠŤÁLKOVÁ A., ŠAFRATOVÁ M., KUNEŠ J., HRABINOVÁ M., DOSKOČIL I., ŠTĚPÁNKOVÁ Š., HULCOVÁ D., CHLEBEK J., CAHLÍKOVÁ L. *Amaryllidaceae alkaloids from Nerine bowdenii and their biological activities.* – manuskript v přípravě

<sup>45</sup> Alkaloid. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica Inc., 2016 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/alkaloid>