

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

ALKALOIDY *NARCISSUS* 'DUTCH MASTER' (AMARYLLIDACEAE)
A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA. II.
ALKALOIDS OF *NARCISSUS* 'DUTCH MASTER' (AMARYLLIDACEAE)
AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY. II.

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

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Zdeňka Dvořáková

Ráda bych tímto poděkovala školiteli PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady při odborném vedení této diplomové práce v laboratoři i při jejím vypracování. Chtěla bych také poděkovat prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, za změření cholinesterasových inhibičních aktivit izolovaných látek, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter. Mé poděkování patří také všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za ochotnou pomoc a příjemné pracovní prostředí.

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

V Hradci Králové, 2016

.....

OBSAH

OBSAH	4
PŘEHLED TABULEK	7
PŘEHLED OBRÁZKŮ	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD	10
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 ALZHEIMEROVA NEMOC	12
3.1.1 HISTORIE	12
3.1.2 EPIDEMIOLOGIE	12
3.1.3 KLINICKÁ MANIFESTACE	13
3.1.4 DIAGNOSTIKA	14
3.1.5 ETIOPATOGENEZE	14
3.1.5.1 β -AMYLOID A SENILNÍ PLAKY	14
3.1.5.2 APOLIPOPROTEIN E	15
3.1.5.3 NEUROFIBRILÁRNÍ KLUBKA	16
3.1.5.4 ZÁNĚT A OXIDATIVNÍ STRES	16
3.1.5.5 SNÍŽENÝ OBSAH ACETYLCHOLINU V MOZKU	17
3.1.6 FARMAKOTERAPIE	17
3.1.6.1 INHIBITORY CHOLINESTERAS	18
3.1.6.2 ANTAGONISTÉ NMDA RECEPTORŮ	20
3.1.6.3 FARMAKOTERAPIE NEKOGNITIVNÍCH PORUCH	21
3.1.7 POTENCIÁLNÍ FARMAKOTERAPIE	21
3.1.7.1 INHIBITORY AGREGACE $\alpha\beta$	21
3.1.7.2 INHIBITORY β -SEKRETASY	22
3.1.7.3 INHIBITORY γ -SEKRETASY	22
3.1.7.4 AKTIVÁTORY α -SEKRETASY	22
3.1.7.5 IMUNOTERAPIE	23
3.1.7.6 MODULACE UKLÁDÁNÍ τ -PROTEINU	23
3.1.7.7 INHIBITORY PROLYLOLIGOPEPTIDASY	23
3.1.8 NEFARMAKOLOGICKÁ LÉČBA	24
3.2 ČELEĎ AMARYLLIDACEAE	25
3.2.1 ROD <i>NARCISSUS</i> – OBECNÁ BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA	25
3.2.2 <i>NARCISSUS</i> 'DUTCH MASTER'	26
3.2.3 ALKALOIDY IZOLOVANÉ Z RODU <i>NARCISSUS</i> A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA... ..	27
3.2.3.1 ALKALOIDY LYKORINOVÉHO TYPU	27
3.2.3.2 ALKALOIDY HOMOLYKORINOVÉHO TYPU	28
3.2.3.3 ALKALOIDY HAEMANTHAMINOVÉHO TYPU	28
3.2.3.4 ALKALOIDY TAZETTINOVÉHO TYPU	29

3.2.3.5	ALKALOIDY NARCIKLASINOVÉHO TYPU	30
3.2.3.6	ALKALOIDY MONTANINOVÉHO TYPU	30
3.2.3.7	ALKALOIDY GALANTHAMINOVÉHO TYPU	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	MATERIÁL A VYBAVENÍ	32
4.1.1	ROZPOUŠTĚDLA A CHEMIKÁLIE	32
4.1.2	POMOCNÉ LÁTKY	32
4.1.3	CHROMATOGRAFICKÉ ADSORBENTY	32
4.1.4	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	32
4.2	VŠEOBECNÉ POSTUPY	33
4.2.1	PŘÍPRAVA A ČIŠTĚNÍ ROZPOUŠTĚDEL	33
4.2.2	ODPAŘOVÁNÍ EXTRAKTŮ A FRAKČÍ	33
4.2.3	SUŠENÍ A SKLADOVÁNÍ FRAKČÍ A IZOLOVANÝCH ČISTÝCH LÁTEK.....	33
4.2.4	CHROMATOGRAFIE	33
4.2.4.1	SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE	33
4.2.4.2	TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE	33
4.3	STRUKTURNÍ ANALÝZA.....	34
4.3.1	GC-MS ANALÝZA	34
4.3.2	NMR ANALÝZA.....	34
4.3.3	OPTICKÁ OTÁČIVOST	34
4.4	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH AKTIVIT IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ	34
4.4.1	CHEMIKÁLIE	34
4.4.2	MATERIÁL	35
4.4.3	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	35
4.4.4	PODMÍNKY MĚŘENÍ.....	35
4.4.5	ZÍSKÁNÍ ACHE A BCHE.....	35
4.4.6	STANOVENÍ CHOLINESTERASOVÉ INHIBIČNÍ AKTIVITY	36
4.5	IZOLACE ALKALOIDŮ	37
4.5.1	VÝBĚR ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	37
4.5.2	ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	37
4.5.3	EXTRAKCE DROGY A ZPRACOVÁNÍ EXTRAKTU	37
4.5.4	SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE	38
4.5.5	SEPARACE ALKALOIDŮ Z FRAKCE ND-6 (3,2 G).....	39
4.5.5.1	SEPARACE ALKALOIDŮ Z PODFRAKCE ND-6/4 (0,4 G).....	40
5	VÝSLEDKY	42
5.1	STRUKTURNÍ ANALÝZA (+)-O-METHYLLYKORENINU (ALKALOID ZD-1)	42
5.1.1	NMR ANALÝZA.....	43
5.1.2	MS ANALÝZA.....	44
5.1.3	OPTICKÁ OTÁČIVOST	44
5.2	INHIBIČNÍ AKTIVITA IZOLOVANÉHO ALKALOIDU ZD-1VŮČI CHOLINESTERASÁM	45
6	DISKUZE	46

7	ZÁVĚR	47
8	ABSTRAKT	48
9	ABSTRACT	49
10	POUŽITÁ LITERATURA.....	50

PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1 – Výsledky sloupcové chromatografie	38
Tabulka 2 – Frakce ND-6	40
Tabulka 3 – Podfrakce ND-6/4	41
Tabulka 4 – Výsledky inhibiční aktivity (+)- <i>O</i> -methyllykoreninu	45

PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – <i>Narcissus</i> 'Dutch Master' [54]	26
Obrázek 2 – lykorin.....	27
Obrázek 3 – homolykorin	28
Obrázek 4 – haemanthamin	28
Obrázek 6 – tazettin	29
Obrázek 7 – narciklasin	30
Obrázek 8 – pankracin.....	30
Obrázek 9 – galanthamin	31
Obrázek 11 – kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku	39
Obrázek 12 – GC chromatogram frakce ND-6.....	39
Obrázek 13 – kontrolní TLC podfrakcí ND-6/4	40
Obrázek 14 – (+)- <i>O</i> -methyllykorenin.....	42
Obrázek 15 – ¹ H NMR spektrum (+)- <i>O</i> -methyllykoreninu	43
Obrázek 16 – ¹³ C NMR spektrum (+)- <i>O</i> -methyllykoreninu	44
Obrázek 17 – EI-MS spektrum (+)- <i>O</i> -methyllykoreninu.....	44

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A β	β -amyloid
AD	Alzheimerova nemoc
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AICD	intracelulární C-terminální peptid
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BPSD	behaviorální a psychologické symptomy demence
BChE	butyrylcholinesterasa
CAT	cholinacetyltransferasa
CTF	počítačová tomografie
GAG	glykosaminoglykan
GC-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
GSK3 β	glykogensyntasa kinasa 3 β
MMSE	Mini-Mental State Examination
MRI	magnetická rezonance
NFTs	neurofibrilární klubka
NMR	nukleární magnetická rezonance
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
PET	pozitronová emisní tomografie
POP	prolyloligopeptidasa
PP2A	proteinfosfatasa 2A
RIMA	reverzibilní inhibitory monoaminoxidasy A
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivních formy kyslíku
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie

1 ÚVOD

Následkem výrazného zlepšení zdravotní péče v minulém století došlo k prodloužení a zlepšení kvality lidského života, které vede ke stárnutí populace a vzrůstu počtu nemocných různými civilizačními chorobami. Vedle kardiovaskulárních chorob nebo rakoviny mezi ně patří i demence. Přestože se tato choroba vyskytuje převážně u starší populace, nelze ji považovat za přirozený proces spojený s rostoucím věkem [1]. Všeobecně se nemoci nervové soustavy objevují mezi prvními deseti nejčastějšími příčinami úmrtí ve světě – počet zemřelých vzrostl za 12 let od roku 2000 o jedno procento [2]. Obdobná je i situace v České republice. Ze všech nemocí nervové soustavy zemře zhruba padesát procent lidí v důsledku Alzheimerovy nemoci [2][3][4].

Změny, které v mozku při Alzheimerově nemoci probíhají, způsobují poškození až odumření neuronů. To může mít za následek problémy s pamětí a později i s orientací, komunikací i pohybem. Současná léčba zmírňuje tyto příznaky, ale kauzální léčba zatím není známa. V terapii se používají antagonisté NMDA receptorů, kam patří memantin, a inhibitory acetylcholinesterasy, jako je například galanthamin [5]. Galanthamin byl původně izolovaný z *Galanthus nivalis* L. z čeledi Amaryllidaceae a později i z rostlin *Leucojum* sp., *Narcissus* sp. a *Lycoris* sp. Další látkou přírodního původu působící jako cholinesterasový inhibitor je například Huperzin A. Tento alkaloid byl získán z *Huperzia serrata* Thunb. (Huperziaceae), rostliny dlouhodobě využívané čínskou medicínou [6]. Různé druhy z rodu *Narcissus* obsahují kromě galanthaminu i některé další alkaloidy s podobným účinkem. Jsou to například sanguinin nebo 11-hydroxygalanthamin [7].

Přírodní sloučeniny, které by mohly být použity v terapii Alzheimerovy nemoci, jsou v současnosti intenzivně zkoumány na mnoha vědeckých pracovištích. Výzkumem se zabývá i pracovní skupina ADINACO na katedře farmaceutické botaniky a ekologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Na základě screeningu, zaměřeného na hledání potenciálních zdrojů obsahujících biologicky aktivní látky potenciálně využitelné v terapii AD, byl touto skupinou pro další zkoumání vybrán *Narcissus* 'Dutch Master'.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

- izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě za použití chromatografických metod z vybrané frakce získané na chromatografickém sloupci ze sumárního alkaloidního extraktu z *Narcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae);
- podíl na identifikaci obsahových látek spektrálními metodami (MS a NMR), změření optické otáčivosti;
- podíl na stanovení biologické aktivity izolovaných látek na inhibici lidských cholinesteras a prolyloligopeptidasy, případně stanovení cytotoxicity.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ALZHEIMEROVA NEMOC

Demence je onemocnění postihující kognitivní funkce a chování, s následným ovlivněním pacientova každodenního života. Typické je, že se postupně zhoršuje. Demence se rozděluje na primární (atroficko-degenerativní) a na sekundární provázející jiná onemocnění. Nejčastější ze všech demencí je Alzheimerova nemoc (AD), která představuje 60 % všech případů. Během tohoto chronického onemocnění dochází k atrofickým a degenerativním změnám neuronů mozkové kůry i podkorových oblastí. Pro začátek nemoci jsou typické poruchy paměti, které se spolu s dalšími kognitivními funkcemi v průběhu let zhoršují a vedou ke ztrátě soběstačnosti pacientů a jejich závislosti na ošetrovatelské péči. Onemocnění trvá 5 až 19 let od počátku prvních příznaků [8][9].

3.1.1 HISTORIE

Alois Alzheimer (1864 – 1915), po kterém byla tato nemoc pojmenována, byl německý psychiatr a neuroanatom. Během jeho působení v nemocnici ve Frankfurtu nad Mohanem ho zaujala pacientka Auguste D., která byla hospitalizována roku 1901 s poruchami spánku a paměti, se zmateností a agresivitou. Zemřela o pět let později a v jejím mozku byly objeveny senilní plaky a neurofibrilární klubka uvnitř neuronů. Alzheimer tento případ prezentoval roku 1906 na schůzi jihoněmeckých psychiatrů v Tübingenu. Nevzbudil však velký zájem a nemoc nesoucí jeho jméno na více než padesát let upadla takřka v zapomnění [10].

Na konci šedesátých let minulého století bylo zjištěno, že u většiny pacientů trpících senilitou se nejedná o přirozenou součást stárnutí, ale právě o AD. Přičemž pro potvrzení diagnózy je nezbytné dostatečné množství plaků a neurofibrilárních klubek [11].

3.1.2 EPIDEMIOLOGIE

Demence se vyskytuje asi u 3,9 % osob starších 60 let, z toho je asi u 70 % příčinou AD. Od 65. roku života se počet nemocných AD každých pět let zdvojnásobí [12].

Existují různé rizikové faktory, které mohou zapříčinit vznik AD. V případě familiární formy AD s časným počátkem, která tvoří 2 – 5 % případů se objevují mutace genu kódujícího amyloidový prekurzorový protein (APP) a genů kódujících presenilin 1 a presenilin 2. Přítomnost alely $\epsilon 4$ apolipoproteinu E zvyšuje riziko rozvinutí časně i pozdní formy, nemusí k němu však dojít [12][13].

Mezi další rizikové faktory patří nadváha a hypertenze ve středním věku, ale i podvýživa a příliš nízký tlak ve věku pozdějším. Dále také zvýšená hladina celkového cholesterolu, diabetes mellitus 2. typu, cerebrovaskulární onemocnění a poranění hlavy. Ochranný vliv mají polynenasycené mastné kyseliny a antioxidanty, dostatečná fyzická, intelektuální a sociální aktivita. Protektivní účinek může mít i dlouhodobé užívání nesteroidních antirevmatik [12][13].

3.1.3 KLINICKÁ MANIFESTACE

Na začátku jsou projevy nemoci nenápadné. Pacienti zapomínají, hůře se orientují v prostoru i čase, mají narušené logické myšlení. Nejdříve a v největším rozsahu je postižena epizodická paměť, která závisí na správné funkci hipokampu, později se objevují i poruchy sémantické paměti. Více je postižena paměť krátkodobá. Příznaky AD se téměř lineárně zhoršují. Postižení mají problémy nejprve se složitějšími denními aktivitami, jako je řízení automobilu, později nezvládají ani běžné úkony – oblékání nebo osobní hygienu. Terminální stadia zahrnují inkontinenci, časté poruchy řeči, zapomínání jmen blízkých osob a obličejů. Smrt nastává následkem selhání stability vnitřního prostředí organismu, dochází k bronchopneumoniím nebo úrazům [14].

Vedle symptomů vyplývajících z poruch kognitivních funkcí se obvykle objevují i tzv. behaviorální a psychologické symptomy demence (BPSD). S progresí onemocnění roste výskyt apatie, kterou v pozdním stadiu trpí 90 % pacientů, deprese postihuje až 60 % nemocných. Dalšími symptomy mohou být poruchy spánku, úzkost, agitovanost a podráždění. Někteří pacienti jsou agresivní, trpí halucinacemi či bludy [15]. Příčinou BSPD mohou být selektivní ztráty neuronů, také změny prostředí, pečovatele nebo přidružená onemocnění [16].

3.1.4 DIAGNOSTIKA

V případě AD dochází k postupnému poškozování mozku dlouho předtím, než se objeví klinické příznaky. Včasná diagnóza a zahájení terapie mohou zpomalit následné zhoršování nemoci [17].

Zdali pacient trpí demencí, lze zjistit testováním kognitivních funkcí. Nejčastěji používaným testem je Mini-Mental State Examination (MMSE), který se skládá z jedenácti otázek týkajících se orientace, paměti, rozsahu pozornosti, počítání a vyjadřovacích schopností. Na základě výsledků můžeme určit míru poškození kognitivních funkcí u konkrétního pacienta i jejich vývoj v čase. Pro upřesnění diagnózy je však nezbytné provést další vyšetření [18].

Mezi hlavní identifikační znaky patří zmenšení hipokampu a amygdaly a rozšíření temporálních rohů postranních komor, které nalézáme po vyšetření zobrazovacími metodami (CT, MRI) [14]. Dále je možné v diagnostice AD využít pozitronovou emisní tomografii (PET) a jednofotonovou emisní tomografii (SPECT) [17].

V důsledku vytváření plaků z β -amyloidu ($A\beta_{42}$) dochází ke snížení jeho hladiny v mozkomíšním moku, hladina τ -proteinu tvořícího neurofibrilární klubka je z nejasných důvodů výrazně zvýšená [17].

3.1.5 ETIOPATOGENEZE

Při AD dochází k výraznému poklesu hmotnosti a objemu mozku, v důsledku numerické atrofie a smršťování neuronů. Abnormální neurální aktivita, dysfunkce a ztráta synapsí, a degenerace specifických skupin neuronů jsou hlavní příčinou úbytku kognitivních funkcí. Tyto odchylky jsou pravděpodobně způsobeny vzájemnými interakcemi mezi různými faktory [19]. Teorií vysvětlujících příčinu AD bylo navrženo několik [20].

3.1.5.1 β -AMYLOID A SENILNÍ PLAKY

Etiopatogeneze AD je často vysvětlována hypotézou amyloidové kaskády. β -Amyloid ($A\beta$) je charakteristický protein tvořený z 38 – 43 aminokyselin. Vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) jehož funkce není zcela objasněna, ale

pravděpodobně se podílí na správné funkci neuronů a mozkovém rozvoji. APP je štěpen skupinou enzymů nazývaných sekretasa dvěma možnými způsoby [21].

Neamyloidní cestu zahajuje na povrchu buněk α -sekretasa, jejímž působením vzniká extracelulární solubilní N-terminální fragment označovaný APP α a C-terminální fragment CTF α , ten je dále štěpen γ -sekretasou za vzniku P3 peptidu a intracelulárního C-terminálního peptidu (AICD). V případě amyloidní cesty je APP rozštěpen β -sekretasou za vzniku solubilního APP β a CTF β , z něž se působením γ -sekretasou tvoří AICD a A β [21][22]. Amyloidně vzniklý AICD může působit jako transkripční regulátor, na rozdíl od AICD vzniklého neamyloidní cestou, který je většinou degradován [23].

Gen kódující APP se nachází na 21. chromozomu, kterým se může vysvětlit výskyt znaků AD u pacientů s Downovým syndromem. Funkci γ -sekretasy zprostředkovávají presenilin 1 a 2, jejichž geny jsou lokalizovány na 14. a 1. chromozomu. Mutace v těchto genech se může podílet na zvýšení produkce méně rozpustného a toxičtějšího A β 42, skládajícího se ze 42 aminokyselin. Bylo prokázáno, že A β způsobuje neurální toxicitu, ztrátu synapsí a jejich dysfunkci [20][22].

Extracelulární akumulace a ukládání A β vede ke vzniku tzv. senilních plaků. Rozlišujeme plaky s denzním jádrem a plaky difuzní. V prvním případě je základem denzní jádro tvořené vláknitým amyloidem a obklopené dystrofickými neurity. Tyto plaky se u pacientů s AD vyskytují nejčastěji. Difuzní plaky jsou tvořeny amorfními ložisky A β , nejsou v nich dystrofické neurity a nejsou spojovány s úbytkem synapsí. Běžně se vyskytují i u normální stárnoucí populace [24]. Mohou předcházet vzniku klasických senilních plaků [25].

3.1.5.2 APOLIPOPROTEIN E

Funkcí apolipoproteinu E (ApoE), proteinu složeného z 299 aminokyselin, je zprostředkovávat transport lipidů mezi tkáněmi nebo buňkami. Gen pro ApoE se vyskytuje ve třech polymorfních alelách - ϵ 2, ϵ 3 a ϵ 4, které podmiňují vznik tří izoform lišících se ve 112. a 158. aminokyselině. Největší zastoupení má alela ϵ 3 a to 77,9 %. Alela ϵ 4 se objevuje u 13,7 % populace, avšak u pacientů s AD se vyskytuje s frekvencí asi 40 % a podporuje větší akumulaci a ukládání A β do plaků. Nosičství ϵ 4

také souvisí se zvýšeným zhoršením paměti a úbytkem kognitivních funkcí. Naopak nejméně se vyskytující alela $\epsilon 2$ vykazuje protektivní účinek proti vzniku AD [26].

3.1.5.3 NEUROFIBRILÁRNÍ KLUBKA

Hlavní složkou neurofibrilárních klubek (NFTs) je s mikrotubuly asociovaný τ -protein. Fyziologický význam τ -proteinu spočívá v reakci s tubulinem vedoucí ke vzniku mikrotubulů a stabilizaci jejich struktury. V případě AD je však ireverzibilně hyperfosforylován, a tvorba mikrotubulů je znemožněna. Abnormálně hyperfosforylovaná vlákna jsou pozorována i u dystrofických neuritů a neuropilových vláken. V NFTs zaujímá hyperfosforylovaný τ -protein strukturu párových spirálních vláken, kromě toho se asi 40 % nachází volně v cytosolu. Nadměrně fosforylovaný τ -protein se objevuje i např. u Pickovy choroby, progresivní supranukleární obrny a kortikobazální degenerace, které mohou souviset s mutací genu pro τ -protein na 17. chromozomu [27].

Nadměrnou fosforylací může způsobit nerovnováha mezi kinasovou a fosfatasovou aktivitou. Byla zaznamenána zvýšená aktivita glykogensyntasy kinasy 3β (GSK3 β), která se kromě hyperfosforylace τ -proteinu podílí i na štěpení APP, vedoucí ke zvýšené produkci A β . Vliv může mít i snížená aktivita proteinfosfatasy 2A (PP2A), enzymu zodpovědného za defosforylací τ -proteinu [28].

Normální τ -protein je rozkládán kalpainy, které jsou vápníkovými ionty aktivované neutrální proteasy, a ubikvitin-proteazomovou dráhou. Hyperfosforylovaný τ -protein je vůči těmto způsobům degradace rezistentní [27].

3.1.5.4 ZÁNĚT A OXIDATIVNÍ STRES

Nálezy aktivovaného komplementového systému a cytokinů v mozku svědčí o podílu imunologických procesů na patologii neurodegenerativních onemocnění. Zahájení zánětlivé kaskády v okolí plaků a ložisek τ -proteinu prostřednictvím β -amyloidem aktivované mikroglie vede k uvolňování cytokinů, chemokinů, reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a různých proteolytických enzymů, které mohou způsobit poškození neuronů. Je možné, že aktivace mikroglie ovlivňuje také fosforylací τ -proteinu a vznik NFT [29].

Nerovnováha mezi ROS, RNS a antioxidanty vyúsťuje v oxidační stres, jehož působení vede k poškození biomolekul včetně proteinů, lipidů a DNA. A β může být zdrojem ROS a iniciátorem radikálového poškození biomolekul v mozku včetně peroxidace lipidů [30].

3.1.5.5 SNÍŽENÝ OBSAH ACETYLCHOLINU V MOZKU

Jednou z prvních teorií o příčině vzniku AD byla cholinergní hypotéza popisující specifickou degeneraci cholinergního neurotransmitterového systému [20]. U AD byl zjištěn úbytek acetylcholinu (ACh) v mozku a deficit cholinacetyltransferasy (CAT), enzymu podílejícím se na syntéze ACh a acetylcholinesterasy (AChE), která působí jeho degradaci. Dalším enzymem odbourávajícím ACh je butyrylcholinesterasa (BChE), jejíž hladiny se při AD zvyšují. Zatímco AChE je aktivní převážně v neuronech a axonech, BChE působí spíše v oblastech glie a endoteliálních buňkách. Cholinesterasy se v lidském mozku vyskytují ve dvou izoformách, přičemž AD postihuje především G4 izoformu AChE a G1 izoformu BChE [31].

3.1.6 FARMAKOTERAPIE

Vzhledem k neúplnému objasnění etiopatogeneze AD se v současnosti používá pouze symptomatická terapie, která průběh choroby pouze reguluje a zpomaluje. Hlavním cílem je zlepšení kvality života pacientů a oddálení nástupu těžkých stadií. Existuje farmakoterapie kognitivní, působící na postižené kognitivní funkce a nekognitivní, která je zaměřená na BPSD. Součástí kognitivní terapie jsou hlavně inhibitory cholinesteras a inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému, jejichž použití je založeno na důkazech. Další terapeutika ovlivňují známé patogenetické řetězce, ale jejich použití není založeno na důkazech a podávání je pouze doplňkové. Patří sem například látky zvyšující mozkový metabolismus – nootropika, extrakty z *Ginkgo biloba* L., antioxidanty a estrogenní hormonální substituce u postklimakterických žen. V terapii nekognitivních poruch se používají převážně antidepresiva, hypnotika a antipsychotika [14].

3.1.6.1 INHIBITORY CHOLINESTERAS

V léčbě cholinergního deficitu při AD byly vyzkoušeny různé metody. Většina z nich byla původně zaměřena na přímou náhradu prekurzorů acetylcholinu, tímto způsobem se bohužel nepodařilo zvýšit centrální cholinergní aktivitu. Dále se testovaly agonisté muskarinových a nikotinových receptorů [32]. Ukázalo se však, že lépe snášena je terapie inhibitory cholinesteras (AChE i BChE), která také působí přirozenější uvolňování ACh. Inhibitory cholinesteras mohou zlepšit kognitivní funkce, neuropsychiatrické symptomy pacientů a oddálit progresi onemocnění, obzvláště u pacientů s mírnou až střední AD. Jednotliví zástupci se liší jak ve struktuře a mechanismu inhibice, tak i v míře selektivity a profilu nežádoucích účinků. Efektivita účinku se liší u různých pacientů [31]. Prvním schváleným léčivem z této skupiny byl takrin, který se ale přestal používat vzhledem ke své hepatotoxicitě a periferním nežádoucím účinkům [33].

Donepezil je derivát piperidinu selektivně inhibující AChE. Způsob inhibice je převážně nekompetitivní, reverzibilní. K dosažení ustáleného stavu plazmatické koncentrace dochází po třech až čtyřech týdnech. Absorpce není ovlivněna potravou ani denní dobou. Vazba na plazmatické bílkoviny je vysoká (přibližně 96 %). Donepezil je metabolizován jaterními enzymy CYP2D6 a CYP3A4, přesto nebyla zpozorována hepatotoxicita ani výrazné ovlivnění farmakokinetických parametrů léčiv, jako jsou warfarin a digoxin. Jeho dlouhý plazmatický poločas (70 – 80 h) umožňuje podávání jednou denně, v dávkách 5 nebo 10 mg ve formě tablet. K nejvýraznějšímu zlepšení kognitivních funkcí dochází po dvou až třech měsících od zahájení léčby [31][33].

Rivastigmin patří mezi karbamátové inhibitory působící na AChE i BChE pseudoireverzibilní nekompetitivní inhibicí. Je rychle absorbován z více než 90 %, užití s jídlem absorpci zpomaluje a snižuje maximální koncentraci o 30 %. Na plazmatické bílkoviny se váže poměrně málo (asi 40 %) a jeho plazmatický poločas se pohybuje mezi jednou a dvěma hodinami. Rivastigmin je metabolizován cholinesterasami za vzniku inertního produktu, který je rychle vylučován ledvinami. Podíl cytochromu P450 na metabolizaci není významný, tudíž nedochází k závažným lékovým interakcím. Denně se užívá 1 – 4 mg nebo 6 – 12 mg ve dvou dávkách s jídlem. Existuje ve formě tobolek, roztoku a transdermálních náplastí [31][34].

Galanthamin je terciární alkaloid, který byl izolován z cibulí rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*, například z *Galanthus woronowii* Losinsk. V dnešní době je možná i jeho syntéza. Pro galanthamin je typický duální mechanismus působení, kromě reverzibilní, kompetitivní inhibice AChE, také pozitivně allostericky moduluje nikotinové acetylcholinové receptory. Tyto receptory jsou významné pro paměť a kognitivní funkce, galanthamin je činí citlivější k dostupnému ACh. Inhibiční aktivita vůči BChE je 53krát nižší než k AChE. Absorpce je rychlá, biodostupnost vysoká. Podávání s jídlem zpomaluje rychlost, ale ne rozsah absorpce. Na plazmatické bílkoviny se váže asi z 18 %, plazmatický poločas je asi pět až šest hodin. Galanthamin je primárně metabolizován prostřednictvím enzymů CYP2D6 a CYP3A4, je proto důležité snížení jeho udržovací dávky při současném užití silných inhibitorů těchto enzymů, jako jsou např. paroxetin, ketokonazol a erythromycin. Vylučován je renální exkrecí [35]. Tablety nebo tobolky s řízeným uvolňováním se užívají jednou nebo dvakrát denně při jídle, přičemž doporučená denní dávka je 16 – 24 mg [31].

Huperzin A je seskviterpenový alkaloid získaný z *Huperzia serrata* Thunb [36]. Tato rostlina zaujímá po staletí své místo v čínské medicíně při terapii pohmožděnin, otoků a schizofrenie. Huperzin A patří mezi silné reverzibilní inhibitory AChE, BChE inhibuje minimálně. Ve srovnání s donepezilem má vyšší biologickou dostupnost po perorálním podání a lépe proniká hematoencefalickou bariérou. Ze dvou existujících enantiomerů vykazuje větší inhibiční aktivitu (–)-huperzin A. Huperzin A také tlumí degeneraci neuronů způsobenou A β . Plazmatický poločas je kolem deseti hodin, na metabolizaci se podílejí enzymy CYP1A3 a CYP3A1/2 [37]. Klinické testy ukázaly, že užití v dávce 400 μ g dvakrát denně vede k určitému zlepšení kognitivních funkcí, pozitivně se také projevuje užití v kombinaci s memantinem. Látka zatím není schválena v Evropě a USA pro terapeutické použití [38].

Nežádoucí účinky inhibitorů cholinesterasy na počátku terapie vyplývají z rychlého zvýšení hladiny ACh, které vede ke kompenzačnímu zvýšení hladiny dopaminu v area postrema, to způsobuje gastrointestinální obtíže, jako jsou nauzea, zvracení a průjemy. Zmírnění těchto obtíží napomáhá pomalé zvyšování dávky a užívání s jídlem nebo krátce po jídle. V terapii nevolnosti a zvracení se dají použít centrální antiemetika. Při dlouhodobé léčbě se často objevuje nechutenství vedoucí ke snižování hmotnosti.

Ztrátou selektivity inhibitorů k mozku či jednotlivým mozkovým oblastem může dojít ke kardiorespiračním příhodám, svalovým křečím i poruchám spánku [31].

3.1.6.2 ANTAGONISTÉ NMDA RECEPTORŮ

Základní mechanismus učení a paměti je dlouhodobá potenciace, která je zajištěna neurotransmiterem glutamátem prostřednictvím ionotropních NMDA receptorů. Tyto receptory se ve zvýšené hustotě vyskytují v hipokampu a mozkové kůře. NMDA receptory jsou běžně blokovány Mg^{2+} , ale po synaptickém uvolnění glutamátu dojde k depolarizaci a vstupu Na^+ a Ca^{2+} a výstupu K^+ . Za patologických podmínek je však membrána chronicky depolarizována, dochází k nadměrné extracelulární akumulaci glutamátu a hromadění Ca^{2+} uvnitř buněk, které vede k buněčné smrti prostřednictvím volných radikálů nebo apoptózu indukujících faktorů. Bylo zjištěno, že takto zvyšuje excitotoxicitu $A\beta$ [39].

Antagonisté NMDA receptorů nahrazují Mg^{2+} v iontovém kanálu a tím zabraňují vstupu Ca^{2+} do buněk. V praxi se v terapii AD používá nekompetitivní antagonist **memantin**. Jeho afinita k receptoru je nízká až střední a vzhledem k napěťově závislému mechanismu účinku se rychle uvolní po depolarizaci membrány, takže nedochází k narušení fyziologické funkce glutamátu. Kromě NMDA receptorů působí memantin antagonisticky i na serotoninové $5-HT_3$ receptory, které se podílejí na zhoršení procesu učení a paměti. Jsou také zodpovědné za gastrointestinální vedlejší účinky, jejich blokáda je proto výhodná v kombinované terapii s inhibitory cholinesteras [39][40].

Memantin se vyznačuje úplnou absorpcí z gastrointestinálního traktu a téměř stoprocentní biodostupností. Podání s jídlem absorpci neovlivňuje. Na plazmatické bílkoviny se váže ze 45 % a délka plazmatického poločasu je 60 – 100 hodin. Memantin je málo metabolizován (z 20 %) a z organismu je vylučován v nezměněném stavu ledvinami, může proto interagovat s dalšími léky, které jsou eliminovány tubulární sekrecí (hydrochlorothiazid, cimetidin, ranitidin). Jeho výhodou je, že neinhibuje ani neindukuje žádný z jaterních enzymů. Optimální dávkování je 10 mg dvakrát denně, počáteční dávka 5 mg a zvyšuje se po týdnu o 5 mg. Výhodou memantinu je, že na rozdíl od inhibitorů cholinesteras působí pozitivně i v případě středně těžké a těžké

formy AD. Jeho možné nežádoucí účinky jsou hypertenze, bolesti hlavy a zad, gastrointestinální obtíže, zmatenost a ospalost [39][40].

3.1.6.3 FARMAKOTERAPIE NEKOGNITIVNÍCH PORUCH

Cílem této farmakoterapie je zmírnit BPSD, které doprovázejí AD u více než poloviny pacientů. V terapii deprese jsou léky první volby selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) – citalopram, fluoxetin, fluvoxamin, sertralin. V určitých případech lze použít moklobemid, antidepressivum ze skupiny inhibitorů monoaminoxidasy-A (RIMA), nebo antidepressiva čtvrté generace mirtazapin a venlafaxin. Triciklická antidepressiva se zásadně neužívají, která vzhledem ke své anticholinergní aktivitě mohou prohlubovat kognitivní deficit a působit jako delirogeny. V případě agresivity, agitovanosti nebo poruch vnímání se podávají tzv. atypická neuroleptika zejména tiaprid, risperidon a olanzapin. Klasická neuroleptika jsou nevhodná pro svou neselektivitu a anticholinergní účinky, výjimečně se používá haloperidol u stavů masivního neklidu. Atypická neuroleptika se používají i u nespavosti a úzkosti, kde se pro možné zhoršení kognitivních funkcí neužívají benzodiazepiny. Protože BPSD souvisí se změnami hladin acetylcholinu, dopaminu, noradrenalinu a dalších látek, může i podávání samotných inhibitorů cholinesteras zlepšovat nekognitivní poruchy a snižovat množství podávaných antidepressiv a neuroleptik [17].

3.1.7 POTENCIÁLNÍ FARMAKOTERAPIE

Počet pacientů trpících AD se neustále zvyšuje, přesto v současnosti neexistuje efektivní přístup k léčení nebo prevenci této nemoci. Další výzkum zaměřený na terapii AD je proto nezbytný. V současnosti jsou vyvíjeny a testovány choroby modifikující léky AD, jejichž primárním cílem je zabránění nebo snížení vzniku A β a τ -proteinu, zamezení jejich shlukování a toxickému působení na mozkovou tkáň [41].

3.1.7.1 INHIBITORY AGREGACE A β

Agregace A β vede ke vzniku oligomerů, fibril a protofibril a jejich následnému ukládání do senilních plaků. Tento proces podporují sulfatované glykosaminoglykany (GAG) svou vazbou na rozpustný A β . **Tramiprost** zabraňuje tvorbě fibril kompeticí

o vazebné místo pro GAG. Ve třetí fázi testování se však neprokázalo dostatečné kognitivní zlepšení. Také bylo zjištěno, že tramiprostat podporuje abnormální agregaci τ -proteinu. Na agregaci se také podílejí zinek a měď, ty jsou důležité i pro normální synaptickou funkci NMDA receptorů. Látka **PTB2** se podílí na rozdělení vazby kovů s $A\beta$ a obnovení jejich fyziologických funkcí na synapsi. Druhá fáze testování vykazovala slibné výsledky a látka je podrobena dalšímu zkoumání [41][42].

3.1.7.2 INHIBITORY β -SEKRETASY

Inhibicí β -sekretasy by mohla být snížena produkce $A\beta$. Existují dva druhy β -sekretas, BACE1 a BACE2, přičemž při tvorbě $A\beta$ převažuje činnost BACE1. Nově vytvářené inhibitory β -sekretasy jsou selektivní k BACE1, dobře prostupující hematoencefalickou bariérou a dostupné po perorálním podání. Do klinické fáze testování jich zatím postoupilo pouze několik [41][42]. Látka **MK-8931** prokázala v první fázi testování snížení $A\beta$ v CSF, v současnosti probíhá druhá fáze testování. Další inhibitory, které vykazovaly slibné výsledky v první fázi, jsou **CTS-21166** a **E2609** [43].

3.1.7.3 INHIBITORY γ -SEKRETASY

Slibně se jeví inhibice γ -sekretasy, ta však kromě APP štěpí i některé transmembránové proteiny, které jsou nezbytné pro signalizaci a modulaci diferenciaci a proliferaci buněk. Proto se v současnosti výzkum soustředí na selektivní inhibitory γ -sekretasy, které ovlivňují štěpení APP, aniž by změnily štěpení základních substrátů, čímž snižují výskyt nežádoucích účinků objevujících se u neselektivních inhibitorů [42].

Avagacestat je selektivní inhibitor γ -sekretasy. První fáze výzkumu prokázala, že avagacestat snížil hladiny $A\beta$ a předpokládala se jeho dobrá snášenlivost. Další testy však neprokázaly výrazné zlepšení při podávání relativně dobře tolerované dávky 50 mg denně. Podávání 125 mg denně bylo spojeno se závažnými gastrointestinálními a dermatologickými nežádoucími účinky [44].

3.1.7.4 AKTIVÁTORY α -SEKRETASY

Stimulace α -sekretasy vede ke zvýšení hladiny solubilního $APP\alpha$, který se prostřednictvím GABA podílí na procesu paměti a učení, má antiapoptické

a neuroprotektivní účinky. Do této skupiny patří **etazolát**, který selektivní modulací GABA_A receptorů stimuluje neamyloidní způsob štěpení APP a působí protektivně vůči A β . Jeví se být bezpečný a dobře tolerovaný [45].

3.1.7.5 IMUNOTERAPIE

Další možnost, jak snížit hladiny A β , je imunoterapie. Studována je imunizace aktivní (očkování) i pasivní (monoklonální protilátky). První vakcínou proti amyloidu byla látka **AN1792**, druhá fáze testování však byla přerušena kvůli výskytu meningoencefalitidy. Nové vakcíny proto postrádají části aminokyselin, které jsou pravděpodobně zodpovědné za autoimunitní odpověď T-lymfocytů vedoucí ke vzniku encefalitidy [41]. Příkladem může být vakcína **CAD106**, druhá fáze jejího testování prokázala dostatečnou protilátkovou odpověď, příznivý bezpečnostní profil a je podrobena dalšímu testování [46].

Druhou možností je pasivní imunizace. Infuze monoklonálních protilátek proti A β vyvolá imunitní odpověď bez rizika zánětu indukovaného T-lymfocyty [42]. Nejprostudovanější zástupci **bapineuzumab** a **solanezumab** byly po skočení třetí fáze zamítnuty, kvůli nedostatečnému zlepšení kognitivních funkcí a riziku rozvinutí vazogenního edému v případě bapineuzumabu. **Gantenerumab** a **crenezumab** jsou právě ve druhé fázi testování [43].

3.1.7.6 MODULACE UKLÁDÁNÍ τ -PROTEINU

Ukládání τ -proteinu do NFT může být sníženo inhibitory agregace τ -proteinu, z nichž se nejnadějněji jeví **methylenová modř**, jejíž výzkum je právě ve druhé fázi testování.

Další možností jsou inhibitory GSK3 β , jejíž zvýšená aktivita je spojená s hyperfosforylací τ -proteinu. Příkladem je **lithium**, které by mohlo být využito v prodromálním stadiu AD [42].

3.1.7.7 INHIBITORY PROLYLOLIGOPEPTIDASY

Prolyloligopeptidasa (POP) je serinová proteasa, která štěpí peptidy s prolinem na C-konci, jako jsou např. některé neuropeptidy (substance P, vasopresin a oxytocin). Zvýšená aktivita POP souvisí s některými neurodegenerativními poruchami včetně AD.

Toto zjištění vedlo k výzkumu možných inhibitorů POP, příkladem mohou být analoga pyrazinu a pyrolidinu [47].

3.1.8 NEFARMAKOLOGICKÁ LÉČBA

AD představuje závažný společenský problém, lidé trpící touto chorobou jsou v pokročilých stádiích odkázáni na intenzivní pomoc a podporu rodiny i pečovatelů. Asi 80 % nesoběstačných pacientů je ošetřováno v domácím prostředí. V péči o pacienta je nezbytný celostní a multidisciplinární přístup, nefarmakologická péče hraje významnou roli. Při stanovení diagnózy by měli pacienti a rodinní příslušníci dostat od lékaře kontakt na nejbližší alzheimerovskou společnost a na informační linku, kde mohou získat podrobné informace o nemoci. Pro zachování či zlepšení kognitivních funkcí je důležité cvičení paměti, které probíhá ve formě různých slovních her. Dále se trénuje orientace v realitě a používá se metoda reminiscenční terapie, jež využívá vzpomínek. Pro zmírnění BPSD je důležité vyhovění potřebám pacientů a pravidelný denní rytmus. Komunikace by měla být přizpůsobena pacientových schopnostem přijímat a zpracovávat informace [48].

3.2 ČELEĎ AMARYLLIDACEAE

Do této čeledi patří zhruba tisíc druhů rostlin, které jsou rozděleny do 65 rodů [49]. Jedná se o vytrvalé rostliny, obvykle s cibulemi, občas s hlízami. Listy mohou být přisedlé či řapíkaté, čárkovité, kopinaté i široce eliptické. Charakteristické jsou pravidelné často velké a nápadné oboupohlavné květy. Plodem bývá nejčastěji tobolka, někdy bobule [50].

Většinou jsou pěstovány pro svůj okrasný vzhled. Vědecký zájem vzbudila tato čeleď kvůli výskytu rozličných alkaloidů vyskytujících se převážně v cibulích rostlin. Tyto alkaloidy vykazují antibakteriální, antivirovou, analgetickou, antimykotickou a protinádorovou aktivitu, některé mají schopnost inhibovat činnost AChE a BChE [49].

3.2.1 ROD *NARCISSUS* – OBECNÁ BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Liliopsida

Podtřída: Lilidae

Řád: Amaryllidales

Čeleď: Amaryllidaceae

Rod: *Narcissus* L. [51]

Vzhledem ke snadnosti přirozeně probíhající hybridizace spolu s rozsáhlým pěstováním a šlechtěním je taxonomie tohoto rodu poměrně složitá a proměnlivá. Tyto rostliny pochází převážně ze Středomoří, největší různorodost panuje na Pyrenejském poloostrově, objevují se i v severovýchodní Francii, severní Africe a východním Řecku. *Narcissus tazetta* L. se vyskytuje dokonce i v části Číny a Japonska. Rostou na pastvinách, březích řek, v lesích i skalních štěrbinách ve všech nadmořských výškách [52].

Kvetení nastává na jaře po mírném období chladu. Krátce po odkvětu následuje letní období klidu, díky kterému si cibule zachová dostatečnou vlhkost a i kvůli vysokému obsahu alkaloidů je chráněna před predátory [52].

Přizemní listy jsou na počátku růstu obklopeny listovou pochvou, většina narcisů má dva až čtyři listy, některé kultivary jich však mají až osm. Stvol je zakončen květem, který se skládá ze dvou přeslenů po třech okvětních lístcích, šesti tyčinek a spodního

semeníku. Mezi okvětními lístky a tyčinkami se nachází pro květy narcisů je typická trubkovitá pakorunka [52].

3.2.2 *NARCISSUS* 'DUTCH MASTER'

Podle barevnosti květů a pakorunky se narcisy dělí do dvanácti skupin a následujících podskupin. První a nejvýznamnější skupina jsou trubkovité narcisy, s velkými jednotlivými květy, jejichž pakorunka je delší než okvětní lístky. Vznikly z planého druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. Do této skupiny patří i *Narcissus* 'Dutch Master' charakteristický svými zlatožlutými květy asi deset centimetrů širokými, který dorůstá výšky 45 – 60 centimetrů [53].



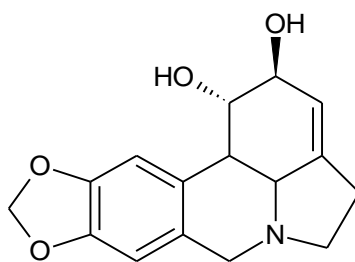
Obrázek 1 – *Narcissus* 'Dutch Master' [54]

3.2.3 ALKALOIDY IZOLOVANÉ Z RODU *NARCISSUS* A JEJICH BIOLOGICKÁ

AKTIVITA

V čeledi Amaryllidaceae se vyskytuje devět strukturálních typů alkaloidů: lykorinový, homolykorinový, haemanthaminový, tazettinový, narciklasinový, montaninový a galanthaminový, norbelladinový a krininový. Krininový a norbelladinový typ se v rostlinách rodu *Narcissus* nevyskytují [55].

3.2.3.1 ALKALOIDY LYKORINOVÉHO TYPU



Obrázek 2 – lykorin

Lykorin – první izolovaný alkaloid čeledi Amaryllidaceae, působí analgetickým, protivirovým, antimykotickým, antiparazitickým a antimalarickým efektem. Vykazuje protinádorovou aktivitu potlačením proliferace rakovinných buněk a indukci jejich apoptózy, což by mohlo být využito v terapii leukemie (apoptóza HL-60 buněk) nebo mnohočetného myelomu (působení na KM3 buňky) [55]. Na rozdíl od acetylovaných a etherifikovaných derivátů je jeho inhibiční aktivita vůči AChE velmi slabá [56].

Pseudolykorin – jeho protinádorová a protivirová aktivita je podobná jako v případě lykorinu [55].

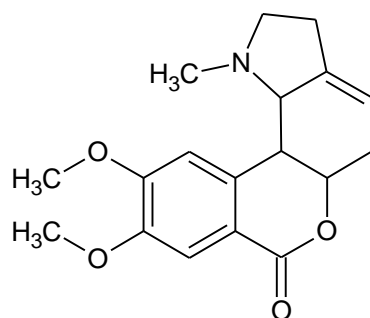
Galanthin – působí analgeticky, hypotenzivně, protinádorově, antimalaricky. Inhibiční aktivita vůči AChE je vyšší než v případě lykorinu [55].

Karanin – jeho aktivita je slabě analgetická, antikonvulzivní a hypotenzivní, inhibitor AChE, působí také proti myším leukemickým buňkám P388 [52].

Assoanin, oxoassoanin – inhibiční působení na AChE [57].

Další alkaloidy jsou **roserin, vaskonin, tortuosin, narcissidin, pluviin, poetaminin** atd. [52].

3.2.3.2 ALKALOIDY HOMOLYKORINOVÉHO TYPU



Obrázek 3 – homolykorin

Alkaloidy této skupiny působí inhibičně na růst jaterních HepG2 a leukemických Molt-4 nádorových buněk, ale jsou cytotoxické i vůči nenádorovým LMTK buňkám myších fibroblastů [49].

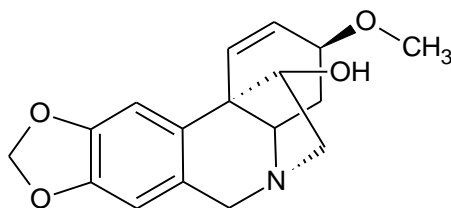
Homolykorin – jeho aktivita proti retrovirům je vysoká s nízkým terapeutickým indexem [58], podílí se na snižování krevního tlaku [59].

Hippeastrin – má antimykotický efekt, výrazný hlavně vůči *Candida albicans* [49] a antimalarický účinek [60].

Lykorenin – snižuje krevní tlak a tepovou frekvenci [61], působí analgeticky.

Do této skupiny patří také například **dubiusin**, **poetinatin**, **odulin** a **masonin** [52].

3.2.3.3 ALKALOIDY HAEMANTHAMINOVÉHO TYPU



Obrázek 4 – haemanthamin

Haemanthamin – vykazuje vysokou antiproliferativní aktivitu proti nádorovým buňkám A2780 vaječníků, T-47D prsu, WiDr střeva a plicních SW1573 [62]. Cytotoxický účinek má i v případě lymfatické leukemie (Molt 4 buňky), jaterního (HepG2 buňky) a prostatického karcinomu (LNCaP buňky), působí také na LMTK buňky. Působí analgeticky a protizánětlivě, hypotenzivně [55] a antimalaricky [63].

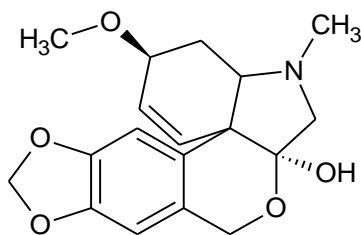
Haemanthidin – má podobnou antiproliferativní aktivitu jako haemanthamin [62], antiprotozoální [63] a protizánětlivou [64].

Krinamin – kromě podobného cytotoxického účinku jako u haemanthaminu [55] vykazuje významnou aktivitu proti buňkám lidského adenokarcinomu A549 a promyelocytickým leukemickým buňkám HL-60 [65]. Dále způsobuje dechový útlum a snížení krevního tlaku. Má antioxidační, střední antimalarickou a antimikrobiální aktivitu proti *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Pseudomonas aeruginosa* [66].

Maritidin, papyramin – vykazují antineoplastickou aktivita podobnou haemanthaminu [55].

Vittatin – působí antibakteriálně proti *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [67], může zesílit analgetický účinek morfinu [66].

3.2.3.4 ALKALOIDY TAZETTINOVÉHO TYPU



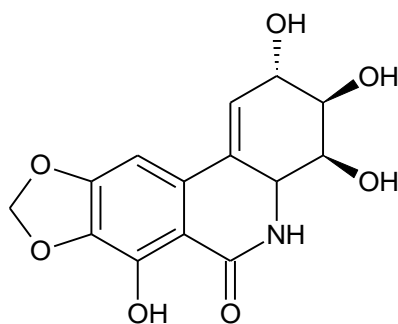
Obrázek 5 – tazettin

Pretazettin – inhibuje růst epiteliálních nádorových HeLa buněk a reverzní transkriptasu viru aviární leukózy. Účinně působí také proti viru Rauscherovy leukemie, Ehrlichovu karcinomu, spontánní AKR lymfocytární leukemii a Lewisovu plicnímu karcinomu [68]. Působí inhibičně na aktivitu P-glykoproteinu a zvyšuje účinek doxorubicinu [69]. Je aktivní i proti Molt4 buňkám a *Herpes simplex* viru [55].

Tazettin – vykazuje mírnou protinádorovu aktivitu, je slabě cytotoxický vůči fibroblastickým LMTK buňkám [55] a působí slabým antimalarickým účinkem [70]. Jeho prekurzorem je pretazettin, který po přesmyku na tazettin, ztrácí většinu ze své biologické aktivity [55].

Jonquailin – je efektivní proti rezistentním nádorům a zvyšuje účinek paklitaxelu [71].

3.2.3.5 ALKALOIDY NARCIKLASINOVÉHO TYPU



Obrázek 6 – narciklasin

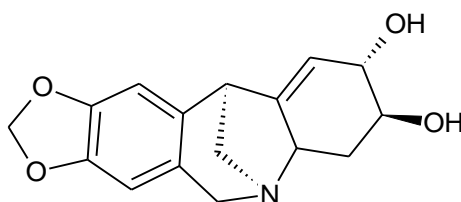
Narciklasin – působí antimitoticky proti maligním buňkám sarkomu 180, je vysoce toxický k Ehrlichovu karcinomu, k HeLa a HEP_H rakovinným buňkám. Vazbou na ribozomální podjednotku 60S brání vzniku peptidové vazby a tím i nového proteinu. Jeho antivirotická aktivita se projevuje hlavně proti flavivirům a bunyavirům, také proti Rauscherově leukemii. Antimykoticky působí proti *Cryptococcus neoformans* [72]. Jedná se o silný inhibitor CYP3A4 [73].

Ismin - působí cytotoxicky proti Molt 4 a LMTK buňkám [52].

Pankratistatin – je aktivní proti leukemickým buňkám P388, proti myšímu ovariálnímu karcinomu M-5076 a HL-60 buňkám. Stejně jako narciklasin působí proti flavivirům a bunyavirům, má antiparazitický účinek [72].

Trisferidin – prokázal antiretrovirovou aktivitu [74].

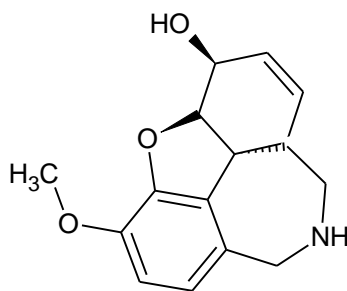
3.2.3.6 ALKALOIDY MONTANINOVÉHO TYPU



Obrázek 7 – pankracin

Pankracin – působí antiprotozoárně proti *Trypanosoma brucei rhodesiense* a *T. cruzi*, *Leishmania donovani* a *Plasmodium falciparum* [75] a antibakteriálně proti *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* [72].

3.2.3.7 ALKALOIDY GALANTHAMINOVÉHO TYPU



Obrázek 8 – galanthamin

Galanthamin – kromě inhibice AChE a stimulace nikotinových receptorů působí galanthamin silně analgeticky, antikonvulzivně a hypotenzivě. Kompenzuje respirační útlum vyvolaný opioidy a neuromuskulární blokádu vyvolanou myorelaxancii kurarového typu [52]. Vychytáváním reaktivních forem kyslíku působí neuroprotektivně [76].

Epigalanthamin – má vyšší hypotenzivní účinek než galanthamin a je méně toxický, ale jeho anticholinesterázová aktivita je nižší [52].

Norgalanthamin – působí cytotoxicky proti Molt 4 a LMTK buňkám [52].

Epinorgalanthamin – vykazuje anticholinesterázovou aktivitu nižší než galanthamin [77].

Narwedín – působí jako dechový stimulátor, inhibuje působení hypnotik a zesiluje analgetickou aktivitu morfinu a farmakologické působení kofeinu, karbazolu, arekolinu a nikotinu [78]. Další účinky jsou hypotenze a snížení srdeční frekvence [52].

Sanguinin – inhibuje AChE desetkrát více než galanthamin, ale jeho biodostupnost je nižší [79].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A VYBAVENÍ

4.1.1 ROZPOUŠTĚDLA A CHEMIKÁLIE

- chloroform p. a. (CHCl_3) (Penta a.s.)
- cyklohexan p. a. (cHx) (Penta a.s.)
- diethylamin p. a. (Et_2NH) (LachNer)
- diethylether (Et_2O) (Penta a.s.)
- destilovaná voda (H_2O)
- ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p. a. (EtOH) (Penta a.s.)
- ethylacetát (EtOAc) (Penta a.s.)
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (LB) (Penta a.s.)
- *n*-hexan p. a. (Hx) (Penta a.s.)
- toluen p. a. (To) (Penta a.s.)
- detekční činidla
 - Dragendorffovo činidlo – roztok tvořený 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml destilované vody a roztok tvořený 16 g jodidu draselného v 40 ml destilované vody smíšených v poměru 1:1
 - Meyerovo činidlo – tvoří 1,36 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného rozpuštěných ve 100 ml vody

4.1.2 POMOCNÉ LÁTKY

- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)

4.1.3 CHROMATOGRAFICKÉ ADSORBENTY

- Kieselgel SiO_2 60 F254 (Merck), velikost 20x20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm
- oxid hlinitý (neutrální Al_2O_3) deaktivovaný 6% H_2O , zrn 40-200 μm (ACROSS)

4.1.4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

- vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland)

- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany)
- plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)

4.2 VŠEOBECNÉ POSTUPY

4.2.1 PŘÍPRAVA A ČIŠTĚNÍ ROZPOUŠTĚDEL

Před použitím byla všechna rozpouštědla destilována, za účelem přečištění. Uchovávala se chráněna před světlem v hnědých skleněných nádobách.

4.2.2 ODPAŘOVÁNÍ EXTRAKTŮ A FRAKČÍ

Frakce získané sloupcovou nebo preparativní chromatografií byly odpařeny na vakuové odparce za sníženého tlaku při 40 °C.

4.2.3 SUŠENÍ A SKLADOVÁNÍ FRAKČÍ A IZOLOVANÝCH ČISTÝCH LÁTEK

Získané frakce a izolované čisté látky byly po odpařené umístěny na nejméně 24 hodin do exsikátoru a poté byly uchovávány v chladničce při 2 – 8 °C.

4.2.4 CHROMATOGRAFIE

4.2.4.1 SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE

Kolona pro sloupcovou chromatografii se naplnila adsorbentem (neutrální oxid hlinitý (ACROSS deaktivovaný 6 % H₂O, velikost zrn 40-200 µm), na něj se navrstvil roztok vzorku ve směsi s adsorbentem (roztěr).

4.2.4.2 TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE

Vzestupná tenkovrstvá chromatografie byla prováděna v uzavřených komorách, které byly nasyceny parami mobilní fáze. Přítomnost alkaloidů se zjišťovala pozorováním pod UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm. Po postřiku Dragendorffovým činidlem se skvrny alkaloidů zbarvily oranžově.

4.3 STRUKTURNÍ ANALÝZA

4.3.1 GC–MS ANALÝZA

Měření hmotnostních spekter probíhalo na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v režimu EI při 70 eV. Pro separaci byla použita kolona DP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies Santa Clara, California, USA). Počáteční teplota 100 °C se zvyšovala rychlostí 15 °C/min do teploty 180 °C, ta byla udržována po dobu 1 minuty. Teplota dále rostla rychlostí 5 °C/min do hodnoty 300 °C a byla udržována po dobu 40 minut. Injektor byl nastaven na teplotu 280 °C, průtok nosného plynu helia byl 0,8 ml/min. Teplota detektoru byla 200 °C a detekční rozmezí m/z 35 – 600. 1 µl alkaloidního roztoku (1 mg/ml) byl nastříknut ve „split mode“ při poměru 1:10. Identifikace alkaloidů byla provedena porovnáním jejich MS spekter se spektry v NIST knihovně, v literatuře a s ostatními spektry látek, které byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

4.3.2 NMR ANALÝZA

NMR spektra se měřila na přístroji Varian Iniova 500. Pracovní frekvence byla 499,9 MHz pro ¹H a 125,7 MHz pro ¹³C. Spektra ¹H byla měřena v inverzní 5 mm ID PGF sondě s využitím standartních pulzních frekvencí. Pro měření ¹³C spektra byla využita 5 mm SW širokopásmá sonda. Měření bylo provedeno v deuteriochloroformu při teplotě 25 °C.

4.3.3 OPTICKÁ OTÁČIVOST

Optická otáčivost byla měřena polarimetrem P3000 (A. Krüss Optronic, Germany) v prostředí chlorofomu při teplotě 25 °C.

4.4 STANOVENÍ INHIBIČNÍCH AKTIVIT IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ

4.4.1 CHEMIKÁLIE

- acetylthiocholin jodid – (Sigma-Aldrich) (použit 10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid – (Sigma-Aldrich) (použit 10mM roztok)

- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ – (Sigma-Aldrich)(použít 5mM roztok
- 5mM fosfátový pufr, pH 7,4
 - zásobní roztok A: 10mM roztok NaH_2PO_4
 - zásobní roztok B: 10mM roztok Na_2HPO_4
 - smíchá se 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody
- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
- 100mM Fosfátový pufr, pH 7,4
 - zásobní roztok A: 200mM roztok NaH_2PO_4
 - zásobní roztok B: 20 mM roztok Na_2HPO_4
 - smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody
- huperzin A 95% (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- fysostigmin 98% (Sigma-Aldrich)
- dimethylsulfoxid p. a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)

4.4.2 MATERIÁL

- acetylcholinesterasa – zdrojem je hemolyzát lidských erytrocytů
- butyrylcholinesterasa – zdrojem je lidská plazma

4.4.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

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

4.4.4 PODMÍNKY MĚŘENÍ

Měření probíhá za teploty 37 °C v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4). Vznikající barevné produkty byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm (AChE) a 412 nm (BChE) v případě cholinesterasové aktivity.

4.4.5 ZÍSKÁNÍ ACHE A BCHE

Erytrocyty byly získány z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků. Ihned po odběru byla krev rozdělena po 5 ml a odstředěna centrifugací při rychlosti

4000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Odebrala se plazma tak, aby v ní nebyly erythrocyty, a byla uchovávána při 4 °C do doby stanovení aktivity BChE (nejdéle 6 hodin). Zbytek plazmy z erythrocytárního sedimentu se odsál bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička je sestřižena. Odečetl se objem erythrocytární masy a po naředění takovým množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného se suspenze rozdělila do zkumavek o objemu 13 ml. Poté se provedla centrifugace stejným způsobem, jako je uvedeno výše. Promytí se provedlo 3x, dokonale se odstranila promývací kapalina a následně se přidalo množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného potřebné pro poměr erythrocyty:pufr 1+9. Poté se směs homogenizovala, přelila do Erlenmayerovy baňky a za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm se erythrocyty nechaly spontánně hemolyzovat. Po skončení hemolýzy se stanovila aktivita suspenze. Hodnotu absorbance bylo možné upravit 5mM fosfátovým pufrem, aby byla její hodnota 0,08 – 0,15. Hemolyzát se uchovával do doby použití při -22 °C.

Stanovení cholinesterasové aktivity plazmy se provádělo stejným způsobem, přičemž hodnota absorbance musí být 0,15-0,20 a uchovávání bylo stejné jako v případě hemolyzátu.

4.4.6 STANOVENÍ CHOLINESTERASOVÉ INHIBIČNÍ AKTIVITY

Pro stanovení inhibiční aktivity (hodnoty IC_{50}) se využila Ellmanova spektrofotometrická metoda za použití 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [80]. Jako substráty byly použity estery thiocholinu, které vytvořily s DTNB žlutě zbarvený produkt, stanovovaný spektrofotometricky. Sleduje se pokles absorbance za 1 minutu. V programu GraphPad Prism (verze 5.02 pro Windows, Graph Pad Software, San Diego, California, USA) byla z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BChE nelineární regresí vypočítána IC_{50} . Hodnota IC_{50} byla vyjádřena v μ M.

Při měření aktivity enzymů se do jamek mikrotitračních destiček napipetovalo 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, přidalo se 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Po dvouminutovém promíchání se směs inkubovala v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Přidalo se 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10 mM butyrylthiocholinjodidu) a změřila se absorbance při příslušné vlnové délce (AChE-hemolyzát: 436 nm; BChE-plazma: 412 nm).

Stanovení aktivity látky probíhalo stejným postupem, ale místo samotného DMSO, který se použil pouze do jamek se srovnávacím roztokem, se přidávaly roztoky měřené látky v DMSO o koncentracích 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM.

Inhibice v procentech byla vypočítána podle vzorce: $\%I = 100 - \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \times 100$, kde ΔABL je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔASA je nárůst absorbance měřeného vzorku. Stanovená hodnota IC_{50} v μM byla porovnána s hodnotami referenčních látek galanthamin, fysostigmin a huperzin A.

4.5 IZOLACE ALKALOIDŮ

4.5.1 VÝBĚR ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

Rostlina *Narcissus* 'Dutch Master' byla vybrána pro studium biologických aktivit alkaloidů homolykorinového typu, které se mohou podílet na inhibiční aktivitě vůči BChE ($IC_{50\text{ BChE}} = 25,5 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$) [81].

4.5.2 ROSTLINNÝ MATERIÁL

Droga byla objednána u firmy: Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Verifikaci provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

4.5.3 EXTRAKCE DROGY A ZPRACOVÁNÍ EXTRAKTU

Příprava alkaloidního extraktu a jeho následná sloupcová chromatografická separace byla provedena Mgr. Danielou Hulcovou v rámci její disertační práce.

27,247 kg cibulí *Narcissus* 'Dutch Master' bylo extrahováno po částech EtOH 96% (500 g cibulí 2×2 l EtOH po 30 minutách varu). Spojené ethanolové extrakty byly odpařeny na vakuové odparce. K získanému odparku (450 g) byla přidána 2% HCl (1 l) na pH 1-2, objem suspenze byl doplněn na 5 l. Vzniklá suspenze pak byla přefiltrována přes křemelinu. Čirý kyselý roztok byl vytřepán po částech $3 \times 1,5$ Et₂O. Vodná fáze byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH cca 9-10 a extrahována $3 \times 1,5$ l EtOAc.

Alkaloidní sumární EtOAc extrakt (95 g) byl zahuštěn na vakuové odparce, následně rozpuštěn přidáním 500 ml 2% HCl (na pH 1-2) a $3 \times$ extrahován 300 ml Et₂O. Po alkalizaci 10% Na₂CO₃ na pH cca 10 byla vodná fáze extrahována 4×350 ml Et₂O. Protože ve vodné fázi zůstávali alkaloidy (detekce alkaloidů byla provedena

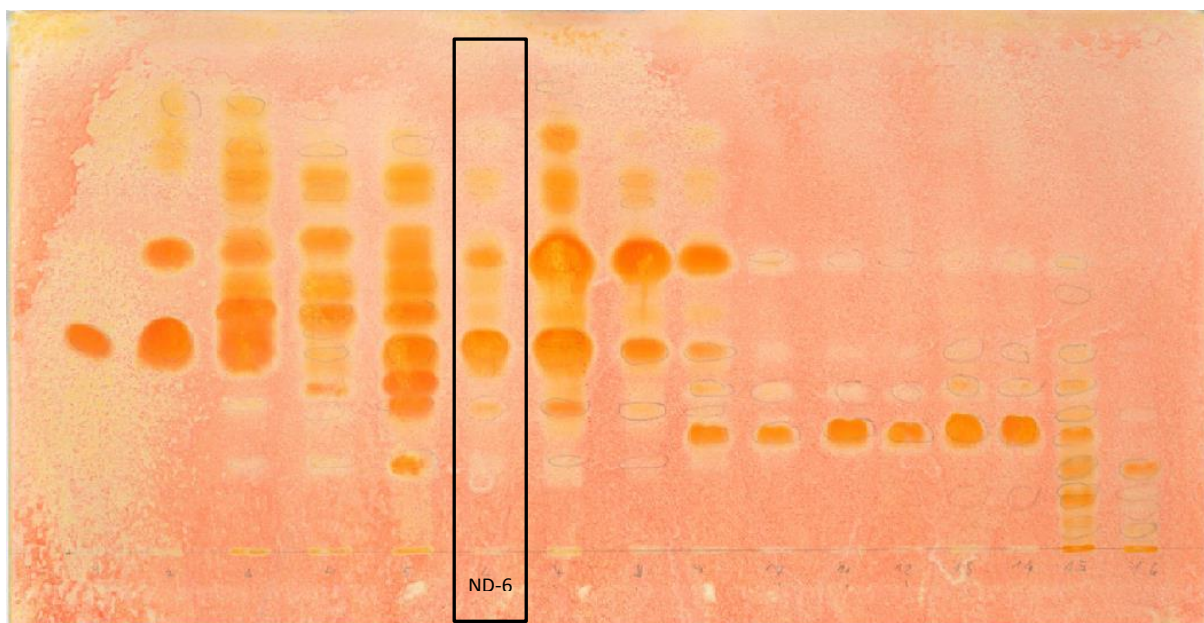
Mayerovým činidlem), byla vodná část extrahována CHCl_3 (4x 350 ml). Oba extrakty byly spojeny a odpařeny. Bylo získáno 58,52 g alkaloidního extraktu.

4.5.4 SLOUPCOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Výsledný extrakt byl dále separován na sloupcové chromatografii. Kolona o délce 62 cm a průměru 7,1 cm byla naplněna stacionární fází 2 500 g oxidu hlinitého (neutrální Al_2O_3 (ACROSS) deaktivovaný 6 % H_2O , velikost zrn 40-200 μm), na něj se navrstvil roztěr (58,52 g výsledného extraktu adsorbovaného na 293 g oxidu hlinitého). Jako mobilní fáze pro skokovou chromatografii byla použita směs CHCl_3 :LB (3:7, 2:3, 1:1, 11:9, 3:2, 13:7, 3:1, 4:1, 17:3, 9:1), CHCl_3 a CHCl_3 +EtOH (1:1). Mrtvý objem byl 2,3 l. Celkem bylo najímáno 301 frakcí, které byly jímány po 250 ml a monitorovány TLC. Frakce s alkaloidy se stejnými R_f faktory byly spojeny – celkově bylo získáno 16 spojených frakcí.

Tabulka 1 – Výsledky sloupcové chromatografie

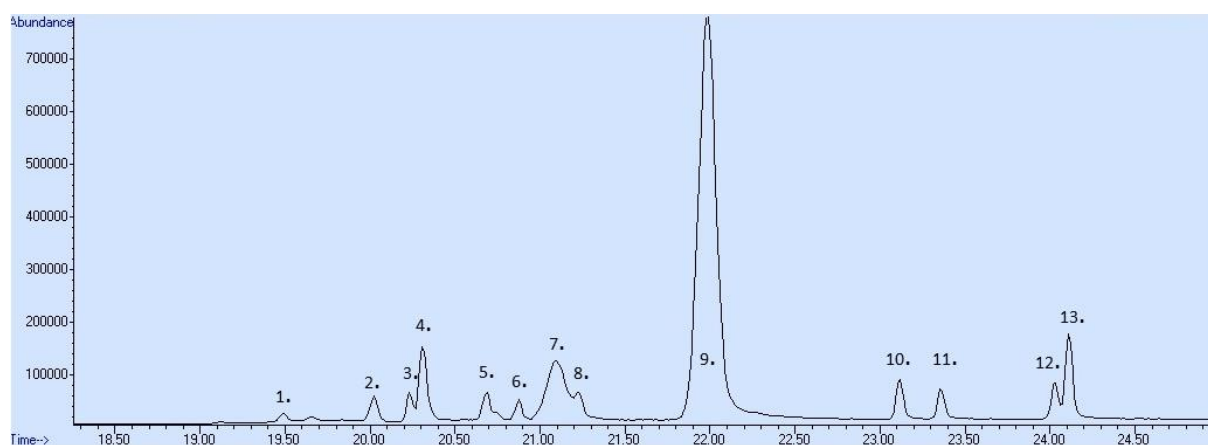
	frakce	hmotnost
ND1	46-51	0,4
ND2	51-57	1,11
ND3	58-82	9,3801
ND4	83-94	2,4861
ND5	95-138	7,8462
ND6	139-165	3,2142
ND7	166-194	4,8267
ND9	195-206	1,1092
ND11	207-289	14,9347
ND15	290-292	7,24
ND16	293-301	1,68
Celkem		54,2272



Obrázek 9 – Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku (SiO_2 60 F254), detekce UV + Dragendorffovo č., soustava $\text{To} + \text{Et}_2\text{NH}$ 9:1, dráha 8,5 cm, počet vyvíjení 1x.

4.5.5 SEPARACE ALKALOIDŮ Z FRAKCE ND-6 (3,2 G)

Podle GC-MS analýzy (obr. 10) obsahuje tato frakce alespoň 13 alkaloidů, většina je homolykorinového typu (alkaloidy 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 a 13) - tento typ je charakterizován štěpem molekuly (m/z) 109. Podle databáze NIST byla velká strukturní podobnost shledána u alkaloidu 10 (77,7% shoda – masonin) a 11 (96,4% shoda – galanthin), ostatní alkaloidy podle této databáze nešlo určit.



Obrázek 10 – GC chromatogram frakce ND-6

Jednotlivé alkaloidy byly separovány z frakce ND-6. Tato frakce byla rozpuštěna ve směsi CHCl_3 a EtOH a rozdělena preparativní TLC na 60 litých deskách (SiO_2 GF254, $15 \times$

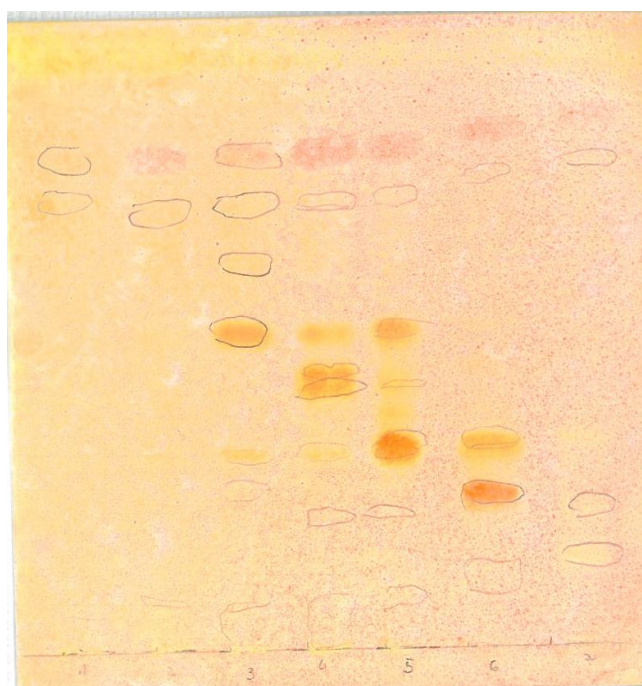
15 cm, dráha 13 cm) za použití mobilní fáze TO+ Et₂NH (9:1), vyvíjeno 4×. Získány byly 4 podfrakce.

Tabulka 2 – Frakce ND-6

Frakce	Hmotnost [g]	Rf
1	0,39	0,78
2	0,45	0,52
3	1,80	0,38
4	0,4	0,28

4.5.5.1 SEPARACE ALKALOIDŮ Z PODFRAKCE ND-6/4 (0,4 G)

Separace byla provedena preparativní TLC na 12 deskách (SiO₂ GF254, 15 × 15 cm, dráha 13 cm) v mobilní fázi CH_x+To+Et₂NH 45:45:10, vyvíjeno 3×. Bylo získáno 7 podfrakcí.



Obrázek 11 – Kontrolní TLC podfrakcí ND-6/4

Tabulka 3 – Podfrakce ND-6/4

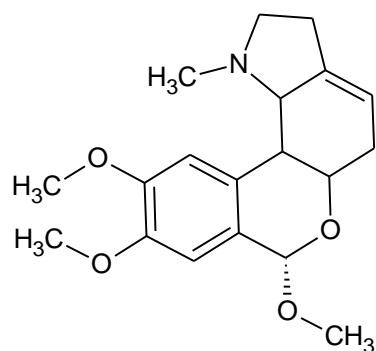
Podfrakce	Hmotnost [mg]	Rf
4/1	10,8	0,89
4/2	18,9	0,78
4/3	32,1	0,52
4/4	35,9	0,44
4/5	83,0	0,33
4/6	60,1	0,25
4/7	52,4	0,13

4.5.5.1.1 SEPARACE ALKALOIDU Z PODFRAKCE 4/5 (83 MG)

Preparativní TLC na 8 deskách (SiO₂ 60 F254 Merck, velikost 10x20 cm, dráha 8,5 cm), za použití mobilní fáze To+Et₂NH 9:1, vyvíjeno 1×. Byly získány 2 zóny. První zóna (Rf 0,58; 18 mg) byla přečištěna vyvinutím na jedné desce ve stejné mobilní fázi, bylo získáno 2,5 mg alkaloidu – nedostatečné množství pro biol. testy, nezpracováváno dále. Druhá zóna (Rf 0,35; 34 mg) byla přečištěna krystalizací, byl získán alkaloid **ZD-1** (7,8 mg).

5 VÝSLEDKY

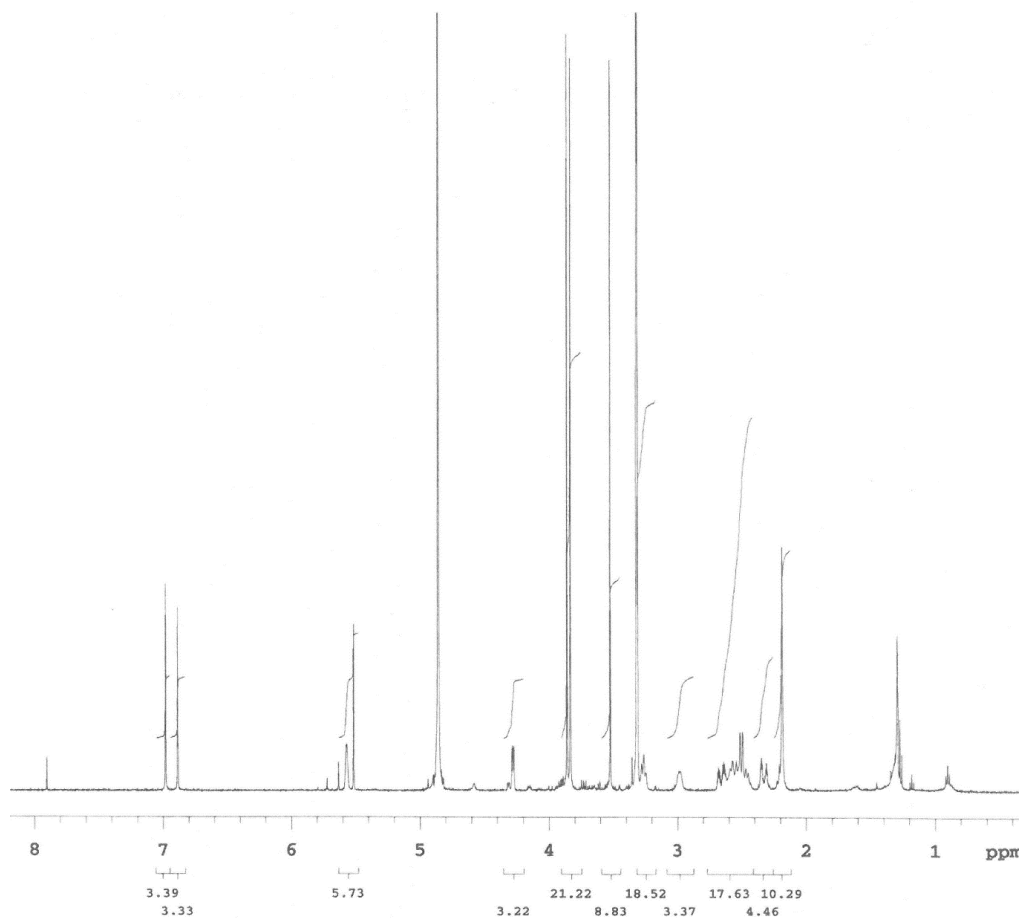
5.1 STRUKTURNÍ ANALÝZA (+)-*O*-METHYLLYKORENINU (ALKALOID ZD-1)



Obrázek 12 – (+)-*O*-methyllykorenin

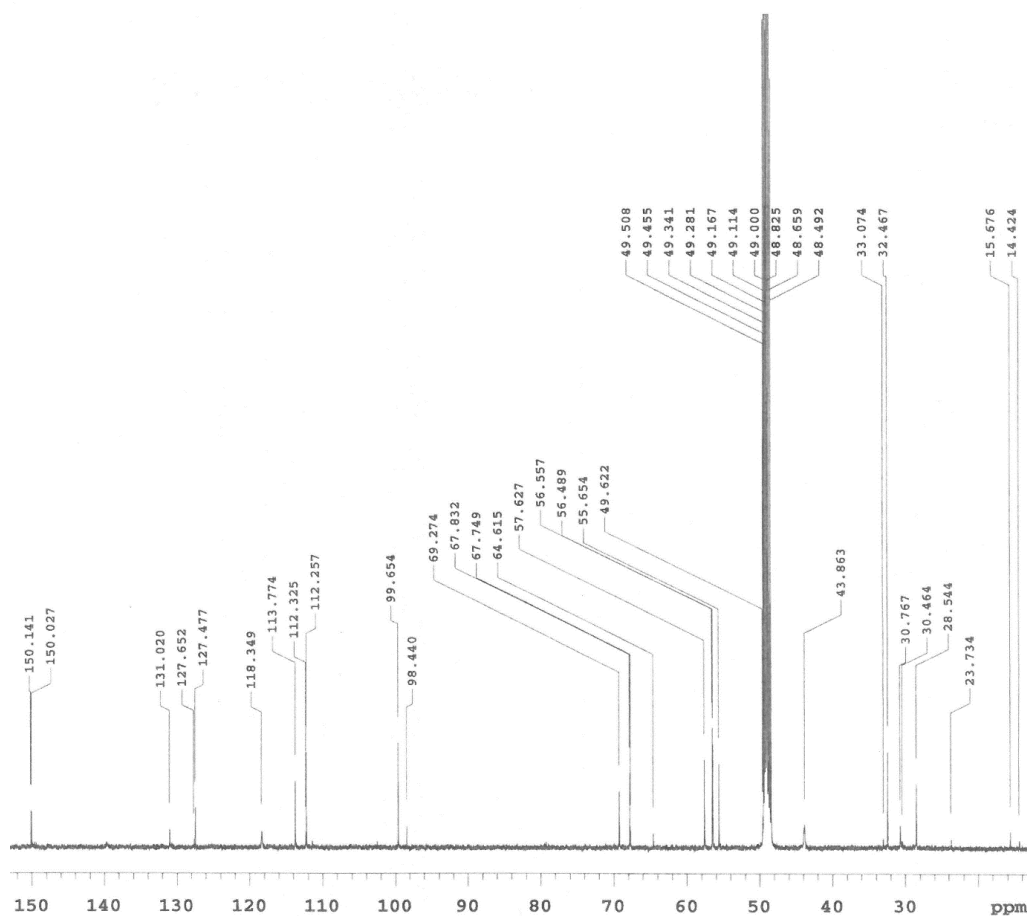
5.1.1 NMR ANALÝZA

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 6.98 (1H, s, CH), 6.89 (1H, s, CH), 5.59-5.55 (1H, m, CH), 5.52 (1H, s, O-CH-O), 4.30-4.27 (1H, m, OCH), 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.53 (3H, s, OCH_3), 3.29-3.21 (1H, m, NCH_2), 3.08-2.95 (1H, m, NCH), 2.73-2.41 (5H, m, CH, NCH_2 , CH_2), 2.39-2.27 (1H, m, CH_2), 2.19 (3H, s, NCH_3)



Obrázek 13 – ^1H NMR spektrum (+)-*O*-methyllykoreninu

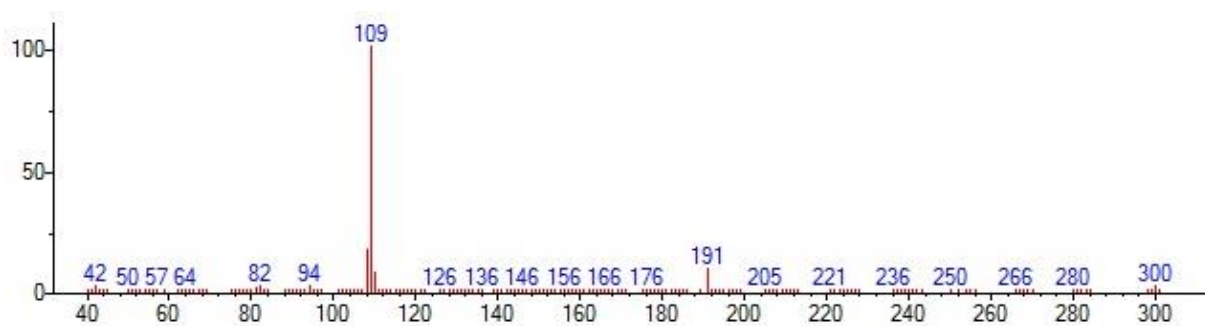
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 150.1, 150.0, 139.8, 131.0, 127.5, 118.3, 113.8, 112.3, 99.7, 69.3, 67.8, 57.6, 56.6, 56.5, 55.7, 43.9, 43.8, 32.5, 28.5



Obrázek 14 – ^{13}C NMR spektrum (+)-*O*-methyllykoreninu

5.1.2 MS ANALÝZA

EI-MS (m/z): 331(1), 300(2), 191(8), 110 (8), 109 (100), 108 (17), 94(3), 82(3), 42(4)



Obrázek 15 – EI-MS spektrum (+)-*O*-methyllykoreninu

5.1.3 OPTICKÁ OTÁČIVOST

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +164^\circ$ (c 0,3; CHCl_3)

5.2 INHIBIČNÍ AKTIVITA IZOLOVANÉHO ALKALOIDU ZD-1VŮČI CHOLINESTERASÁM

Tabulka 4 – Výsledky inhibiční aktivity (+)-*O*-methyllykoreninu

Testovaná látka	AChE (IC ₅₀ , μM)	BChE (IC ₅₀ , μM)
(+)- <i>O</i> -methyllykorenin	>1000	>1000
galanthamin*	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
fysostigmin*	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004
huperzin A*	0,033 ± 0,001	>1000
*standardní inhibitory cholinesteras		

6 DISKUZE

Inhibitory acetylcholinesterasy patří mezi základní látky používané v terapii AD. Významný vliv má také inhibice butyrylcholinesterasy, proto se u nově izolovaných látek měří inhibiční vliv na oba tyto enzymy.

Při hledání dalších látek s potenciální inhibiční aktivitou vůči cholinesterasám byl použit alkaloidní extrakt rostliny *Narcissus* 'Dutch Master', který při předchozím testování vykazoval perspektivní aktivitu vůči BChE ($IC_{50 \text{ BChE}} = 25,5 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$). Extrakt byl sloupcovou chromatografií rozdělen na jednotlivé frakce. Tato práce se zabývá izolací obsahových látek z podfrakce 4 získané z frakce ND 6 za použití preparativní TLC.

V dostatečném množství pro provedení biologických testů byl získán jeden alkaloid. Výsledky NMR, MS analýzy a měření optické otáčivosti prokázaly, že se jedná o alkaloid homolykorinového typu (+)-*O*-methyllykorenin.

Za využití Ellmanovy spektrofotometrické metody byly stanoveny inhibiční aktivity vůči AChE a BChE, jejichž výsledky byly porovnány se standardy galanthaminem ($IC_{50 \text{ AChE}} = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), fysostigminem ($IC_{50 \text{ AChE}} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BChE}} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$) a huperzinem A ($IC_{50 \text{ AChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BChE}} > 1000 \mu\text{M}$). Testy na inhibici cholinesteras u (+)-*O*-methyllykoreninu nebyly dříve prováděny a naměřené hodnoty ($IC_{50 \text{ AChE}} > 1000 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BChE}} > 1000 \mu\text{M}$) bohužel neprokázaly inhibiční aktivitu vůči AChE i BChE. Tyto zjištěné výsledky korelují s údaji v literatuře, neboť alkaloidy homolykorinového typu nevykazují výraznou cholinesterasovou aktivitu [82]. Dříve bylo zjištěno, že tato sloučenina vykazuje slabou antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* a *S. aureus* [83] a cytotoxickou aktivitu proti LMTK buňkám [52].

Látka nebyla izolována v dostatečném množství pro stanovení dalších biologických aktivit (např. inhibici aktivity prolyloligopeptidasy, případně na cytotoxicitu na vybrané nádorové buněčné linie).

Podle dostupných zdrojů nebyl z *Narcissus* 'Dutch Master' (+)-*O*-methyllykorenin dříve izolován, ale byla prokázána jeho přítomnost v *N. bujei*, *N. 'Carlton'*, *N. muñozii-garmendia* [52].

7 ZÁVĚR

Z vybrané frakce ND-6 se prostřednictvím preparativní TLC podařilo izolovat alkaloid ZD-1, který byl na základě NMR, MS analýzy a optické otáčivosti identifikován jako (+)-*O*-methyllykorenin. Alkaloid se podařilo izolovat v dostatečném množství (7,8 mg) pouze pro určení struktury a inhibiční aktivity vůči cholinesterasám.

Alkaloid (+)-*O*-methyllykorenin nevykazoval žádnou výraznou inhibiční cholinesterasovou aktivitu ($IC_{50} \text{ AChE} > 1000 \mu\text{M}$, $IC_{50} \text{ BChE} > 1000 \mu\text{M}$) a tudíž se jeví z hlediska inhibice těchto enzymů jako neperspektivní potenciální terapeutická sloučenina.

8 ABSTRAKT

Dvořáková Zdeňka: Alkaloidy *Narcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae) a jejich biologická aktivita II. Diplomová práce 2016, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.

Náplní této práce byla izolace obsahových látek z vybrané frakce ND-6 získané sloupcovou chromatografií alkaloidního extraktu z *Narcissus* 'Dutch Master'. Příprava extraktu a sloupcové chromatografie alkaloidního výtřepku byla provedena Mgr. Danielou Hulcovou v rámci svého doktorského studia. Prostřednictvím preparativní TLC byl získán z vybrané frakce ND-6 alkaloid homolykorinového typu (+)-*O*-methyllykorenin. Jeho struktura byla určena na základě NMR, GC-MS analýzy a optické otáčivosti. Získaná data byla porovnána s údaji v literatuře.

U izolovaného alkaloidu byla stanovena jeho cholinesterasová inhibiční aktivita vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Jeho inhibiční aktivita byla vyjádřena jako IC_{50} (μM) a porovnána se známými standardy galanthaminem, fysostigminem a huperzinem A. Tento alkaloid je vůči cholinesterasám neaktivní ($IC_{50} \text{ AChE} > 1000 \mu\text{M}$, $IC_{50} \text{ BChE} > 1000 \mu\text{M}$). Na základě získaných výsledků můžeme říct, že se jedná z hlediska inhibice cholinesteras jako potenciálně nevyužitelný v terapii AD.

Klíčová slova: *Narcissus* 'Dutch Master', Amaryllidaceae, homolykorinové alkaloidy, izolace, anticholinesterasová aktivita, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Alzheimerova choroba

9 ABSTRACT

Dvořáková Zdeňka: Alkaloids of *Narcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae) and their biological activity II. Diploma thesis 2016, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology.

The content of this work was isolation of compounds from the selected fraction ND-6 obtained by column chromatography of *Narcissus* 'Dutch Master' alkaloid extract. Preparation of extract and its column chromatography was performed by Mrg. Daniela Hulcová as part of her doctoral studies. By the means preparative TLC was from fraction ND-6 homolycorine type alkaloid (+)-*O*-methyllycorenine gained. Its structure was determined on the basis NMR, GC-MS analysis and optical rotation. The obtained data were compared with facts in known literature.

By the isolated alkaloid was determined its cholinesterase inhibitory activity against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Its inhibitory activity was expressed as IC_{50} (μM) and compared with known standards galanthamine, physostigmine, and Huperzine A. This alkaloid is inactive against cholinesterase ($IC_{50}^{\text{AChE}} > 1000 \mu\text{M}$, $IC_{50}^{\text{BChE}} > 1000 \mu\text{M}$.) On the basis of gained results, we can evaluate this alkaloid from the point of view of cholinesterase inhibition as potentially unusable in the treatment of AD.

Key words: *Narcissus* 'Dutch Master', Amaryllidaceae, homolycorine alkaloids, isolation, anticholinesterase activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease

10 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WELTGESUNDHEITSORGANISATION a ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, ed. *Dementia: a public health priority*. 2012. ISBN 978-92-4-156445-8.
- [2] WHO / *Estimates for 2000–2012* [online]. 9 2015 [vid. 2015-09-13]. Dostupné z: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html
- [3] *Česká republika podle pohlaví a věku (2000 - 2009) | ČSÚ* [online]. 9 2015 [vid. 2015-09-26]. Dostupné z: https://www.czso.cz/csu/czso/4017-10--2000_az_2009--01
- [4] *Česká republika podle pohlaví a věku (2004 - 2013) | ČSÚ* [online]. 9 2015 [vid. 2015-09-14]. Dostupné z: https://www.czso.cz/csu/czso/130065-14-r_2014-01
- [5] ATANASOVA, Mariyana, Georgi STAVRAKOV, Irena PHILIPOVA, Dimitrina ZHELEVA, Nikola YORDANOV a Irini DOYTCHINOVA. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015, roč. 23, č. 17, s. 5382–5389.
- [6] ERDOGAN ORHAN, Ilkay, Gurdal ORHAN a Erdem GURKAS. An overview on natural cholinesterase inhibitors-a multi-targeted drug class-and their mass production. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2011, roč. 11, č. 10, s. 836–842.
- [7] LÓPEZ, Susana, Jaume BASTIDA, Francesc VILADOMAT a Carles CODINA. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*. 2002, roč. 71, č. 21, s. 2521–2529.
- [8] KLÁN, Jan. Demence – závažný medicínský problém stárnoucí populace. *practicus*. 2011, roč. 10, č. 5, s. 18–21.
- [9] LUŽNÝ, Jan, ed. *Gerontopsychiatrie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-573-2.
- [10] HIPPIUS, Hanns a Gabriele NEUNDÖRFER. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2003, roč. 5, č. 1, s. 101.
- [11] TANZI, Rudolph E. a Lars BERTRAM. Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell*. 2005, roč. 120, č. 4, s. 545–555.
- [12] QIU, Chengxuan, Miia KIVIPELTO a Eva VON STRAUSS. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2009, roč. 11, č. 2, s. 111.
- [13] REITZ, Christiane, Carol BRAYNE a Richard MAYEUX. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 2011, roč. 7, č. 3, s. 137–152.

- [14] JIRÁK, Roman. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *neurologia pre prax.* 2008, roč. 9, č. 4, s. 224–227.
- [15] DILLON, Carol, Cecilia SERRANO, Diego CASTRO, Silvina HEISECKE, Fernando TARAGANO a Patricio PEREZ LEGUIZAMON. Behavioral symptoms related to cognitive impairment. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 2013, s. 1443.
- [16] RESSNER, Pavel. Alzheimerova choroba–diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi.* 2004, roč. 4, č. 1, s. 11–16.
- [17] AGRAWAL, Megha a Abhijit BISWAS. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2015, roč. 2.
- [18] FOLSTEIN, Marshal F., Susan E. FOLSTEIN a Paul R. MCHUGH. “Mini-mental state”: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research.* 1975, roč. 12, č. 3, s. 189–198.
- [19] HUANG, Yadong a Lennart MUCKE. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell.* 2012, roč. 148, č. 6, s. 1204–1222.
- [20] ARMSTRONG, Richard. Review article What causes alzheimer’s disease? *Folia Neuropathologica.* 2013, roč. 3, s. 169–188.
- [21] SWERDLOW, Russell H. Pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Clinical interventions in aging.* 2007, roč. 2, č. 3, s. 347.
- [22] O’BRIEN, Richard J. a Philip C. WONG. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer’s Disease. *Annual Review of Neuroscience.* 2011, roč. 34, č. 1, s. 185–204.
- [23] NALIVAEVA, Natalia N., Nikolai D. BELYAEV, Caroline KERRIDGE a Anthony J. TURNER. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimers disease. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2014, roč. 6, s. 1–13.
- [24] SERRANO-POZO, Alberto, Matthew FROSCHE, Eliezer MASLIAH a Bradley HYMAN. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2011, roč. 1, č. 1, s. 1–23.
- [25] CRAS, Patrick, Mitsuru KAWAI, David LOWERY, Patty GONZALEZ-DEWHITT, Barry GREENBERG a George PERRY. Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1991, roč. 88, č. 17, s. 7552–7556.
- [26] LIU, Chia-Chan, Takahisa KANEKIYO, Huaxi XU a Guojun BU. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology.* 2013, roč. 9, č. 2, s. 106–118.
- [27] IQBAL, Khalid, Fei LIU, Cheng-Xin GONG a Inge GRUNDKE-IQBAL. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer Research.* 2010, roč. 7, č. 8, s. 656.

- [28] CHUNG, Sul-Hee. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's. *BMB reports*. 2009, roč. 8, č. 42, s. 467–474.
- [29] ZOTOVA, Elina, James NICOLL, Raj KALARIA, Clive HOLMES a Delphine BOCHE. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res Ther*. 2010, roč. 2, č. 1, s. 1.
- [30] SWOMLEY, Aaron M., Sarah FÖRSTER, Jeriel T. KEENEY, Judy TRIPLETT, Zhaoshu ZHANG, Rukhsana SULTANA a D. Allan BUTTERFIELD. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014, roč. 1842, č. 8, s. 1248–1257.
- [31] BRUNOVSKÝ, Martin. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *neurologia pre prax*. 2007, roč. 8, č. 2, s. 112–117.
- [32] FRANCIS, Paul T., Alan M. PALMER, Michael SNAPE a Gordon K. WILCOCK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999, roč. 66, č. 2, s. 137–147.
- [33] SHIGETA, Masahiro a Akira HOMMA. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS drug reviews*. 2001, roč. 7, č. 4, s. 353–368.
- [34] ONOR, Maria Luisa, Marianna TREVISIOL a Eugenio AGUGLIA. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical interventions in aging*. 2007, roč. 2, č. 1, s. 17–32.
- [35] LILIENFELD, Sean. Galantamine—a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS drug reviews*. 2002, roč. 8, č. 2, s. 159–176.
- [36] ZHAO, Yan, Peng YUE, Tao TAO a Qing-hua CHEN. Drug brain distribution following intranasal administration of Huperzine A in situ gel in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007, roč. 28, č. 2, s. 273–278.
- [37] WANG, Rui, Han YAN a Xi-can TANG. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine1. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006, roč. 27, č. 1, s. 1–26.
- [38] NG, Yu Pong, Terry Cho Tsun OR a Nancy Y. IP. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 2015, roč. 89, s. 260–270.
- [39] THOMAS, Stuart J. a George T. GROSSBERG. Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clinical interventions in aging*. 2009, roč. 4, s. 367.
- [40] ŠVESTKA, Jaromír. Memantin - necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence. *psychiatrie pro praxi*. 2004, roč. 5, č. 3, s. 162–168.

- [41] YIANNOPOULOU, Konstantina G. a Sokratis G. PAPAGEORGIOU. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2013, roč. 6, č. 1, s. 19–33.
- [42] TAYEB, Haythum O., Hyun Duk YANG, Bruce H. PRICE a Frank I. TARAZI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012, roč. 134, č. 1, s. 8–25.
- [43] MIKULCA, Janelle, V. NGUYEN, D. A. GAJDOSIK, S. G. TEKLU, E. A. GIUNTA, E. A. LESSA, C. H. TRAN, E. C. TERAČ a R. B. RAFFA. Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2014, roč. 39, č. 1, s. 25–37.
- [44] CORIC, Vladimir, Stephen SALLOWAY, Christopher H. VAN DYCK, Bruno DUBOIS, Niels ANDREASEN, Mark BRODY, Craig CURTIS, Hilka SOININEN, Stephen THEIN, Thomas SHIOVITZ, Gary PILCHER, Steven FERRIS, Susan COLBY, Wendy KERSELAERS, Randy DOCKENS, Holly SOARES, Stephen KAPLITA, Feng LUO, Chahin PACHAI, Luc BRACOU, Mark MINTUN, Joshua D. GRILL, Ken MAREK, John SEIBYL, Jesse M. CEDARBAUM, Charles ALBRIGHT, Howard H. FELDMAN a Robert M. BERMAN. Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*. 2015, roč. 72, č. 11, s. 1324.
- [45] MARCADE, Maryline, Jérôme BOURDIN, Nadia LOISEAU, Hélène PEILLON, Aurélie RAYER, Dominique DROUIN, Fabien SCHWEIGHOFFER a Laurent DÉSIÉ. Etazolate, a neuroprotective drug linking GABA_A receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing. *Journal of Neurochemistry*. 2008, roč. 106, č. 1, s. 392–404.
- [46] FARLOW, Martin R, Niels ANDREASEN, Marie-Emmanuelle RIVIERE, Igor VOSTIAR, Alessandra VITALITI, Judit SOVAGO, Angelika CAPUTO, Bengt WINBLAD a Ana GRAF. Long-term treatment with active A β immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2015, roč. 7, č. 1.
- [47] HAFFNER, Curt D., Caroline J. DIAZ, Aaron B. MILLER, Robert A. REID, Kevin P. MADAUSS, Annie HASSELL, Mary H. HANLON, David J.T. PORTER, J. David BECHERER a Luke H. CARTER. Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008, roč. 18, č. 15, s. 4360–4363.
- [48] HOLMEROVÁ, Iva, Hana JANEČKOVÁ, Hana VAŇKOVÁ a Petr VELETA. Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy demence a praktické aspekty péče o postižené. *Psychiatr. praxi*. 2005, roč. 6, č. 4, s. 175–178.
- [49] DALECKÁ, Markéta, Radim HAVELEK, Karel KRÁLOVEC, Lenka BRŮUČKOVÁ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy*. 2013, roč. 107, s. 701–708.

- [50] KUBITZKI, Klaus. *Flowering plants, monocotyledons: lilianae (except Orchidaceae)*. 1998. ISBN 978-3-662-03533-7.
- [51] JAHODÁŘ, Luděk. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1791-6.
- [52] HANKS, Gordon R., ed. *Narcissus and daffodil: the genus narcissus*. London ; New York, NY: Taylor & Francis, 2002. Medicinal and aromatic plants--industrial profiles, v. 21. ISBN 978-0-415-27344-2.
- [53] BURNIE, Geoff. *Botanika: ilustrovaný abecední atlas 10 000 zahradních rostlin s návodem, jak je pěstovat*. [Praha]: Slovart, 2007. ISBN 978-80-7209-936-8.
- [54] *WSY0039366_5221.jpg (JPEG obrázek, 407 × 268 bodů)* [online]. jaro 2016 [vid. 2016-01-19]. Dostupné z: https://apps.rhs.org.uk/plantselectorimages/detail/WSY0039366_5221.jpg
- [55] BASTIDA, Jaume, Strahil BERKOV, Laura TORRAS, Natalia PIGNI BELÉN, Jean PAULO DE ANDRADE, Vanessa MARTÍNEZ, Carles CODINA a Francesc VILADOMAT. *Recent advances in pharmaceutical sciences*. Kerala: Transworld Research Network, 2011. ISBN 978-81-7895-528-5.
- [56] WANG, Yue-Hu, Qin-Li WAN, Cheng-Ding GU, Huai-Rong LUO, Chun-Lin LONG a OTHERS. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal*. 2012, roč. 6, č. 1, s. 96.
- [57] MUKHERJEE, Pulok K., Venkatesan KUMAR, Mainak MAL a Peter J. HOUGHTON. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007, roč. 14, č. 4, s. 289–300.
- [58] CHATTOPADHYAY, Debrasad a Trailokya N. NAIK. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2007, roč. 7, č. 3, s. 275–301.
- [59] BERKOV, Strahil, Vanessa MARTÍNEZ-FRANCÉS, Jaume BASTIDA, Carles CODINA a Segundo RÍOS. Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 2014, roč. 99, s. 95–106.
- [60] CEDRÓN, Juan C., David GUTIÉRREZ, Ninoska FLORES, Ángel G. RAVELO a Ana ESTÉVEZ-BRAUN. Preparation and antimalarial activity of semisynthetic lycorenine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, roč. 63, s. 722–730.
- [61] MIYASAKA, Katsuhiko, Yoshio HIRAMATSU a Takayuki TAKEZAKI. Pharmacological studies of lycorenine, an alkaloid of *Lycoris radiata* Herb.: Vasodepressor mechanism in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1979, roč. 29, č. 4, s. 605–622.
- [62] CEDRÓN, Juan, Ángel RAVELO, Leticia LEÓN, José PADRÓN a Ana ESTÉVEZ-BRAUN. Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules*. 2015, roč. 20, č. 8, s. 13854–13863.

- [63] OSORIO, Edison J., Strahil BERKOV, Reto BRUN, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT, Fabio CABEZAS a Jaume BASTIDA. In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters*. 2010, roč. 3, č. 3, s. 161–163.
- [64] BARBOSA-FILHO, José M., Márcia R. PIUVEZAM, Marcelo D. MOURA, Marcelo S. SILVA, Karla V. Batista LIMA, Emídio V. Leitão DA-CUNHA, Ivana M. FECHINE a Orlando S. TAKEMURA. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006, roč. 16, č. 1, s. 109–139.
- [65] SUN, Qian, Yun-Heng SHEN, Jun-Mian TIAN, Jian TANG, Juan SU, Run-Hui LIU, Hui-Liang LI, Xi-Ke XU a Wei-Dong ZHANG. Chemical Constituents of *Crinum asiaticum* L. var. *sinicum* Baker and Their Cytotoxic Activities. *Chemistry & biodiversity*. 2009, roč. 6, č. 10, s. 1751–1757.
- [66] REFAAT, John, Mohamed S. KAMEL, Mahmoud A. RAMADAN a Ahmed A. ALI. *Crinum*; an endless source of bioactive principles: A review. Part v. Biological profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013, roč. 4, č. 4, s. 1239.
- [67] EVIDENTE, Antonio, Anna ANDOLFI, Amina H. ABOU-DONIA, Soad M. TOUEMA, Hala M. HAMMODA, Eman SHAWKY a Andrea MOTTA. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry*. 2004, roč. 65, č. 14, s. 2113–2118.
- [68] BROSSI, Arnold. *The alkaloids. Volume 30*. San Diego; London: Academic Press, 1987. ISBN 978-0-08-086554-6.
- [69] ZUPKO, Istvan, Borbala RETHY, Judit HOHMANN, Joseph MOLNAR, Imre OCSOVSZKI a George FALKAY. Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In vivo*. 2009, roč. 23, č. 1, s. 41–48.
- [70] SENER, Bilge, Ilkay ORHAN a Jutamad SATAYAVIVAD. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*. 2003, roč. 17, č. 10, s. 1220–1223.
- [71] MASI, Marco, Liliya V. FROLOVA, Xiaojie YU, Véronique MATHIEU, Alessio CIMMINO, Annelise DE CARVALHO, Robert KISS, Snezna ROGELJ, Alexander PERTSEMLIDIS, Alexander KORNIENKO a Antonio EVIDENTE. Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla* quail, with activity against drug-resistant cancer. *Fitoterapia*. 2015, roč. 102, s. 41–48.
- [72] KORNIENKO, Alexander a Antonio EVIDENTE. Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. *Chemical Reviews*. 2008, roč. 108, č. 6, s. 1982–2014.
- [73] MCNULTY, James, Jerald J. NAIR, Mohini SINGH, Denis J. CRANKSHAW, Alison C. HOLLOWAY a Jaume BASTIDA. Selective cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009, roč. 19, č. 12, s. 3233–3237.

- [74] OLUYEMISI, Ogbole Omonike, Ajaiyeoba Edith ORIABURE, Adeniji J. ADEKUNLE, Kamdem Soup T. RAMSAY, Sajan SHYYAULA a Muhammad Iqbal CHOUDHARY. Bioassay-guided isolation of Poliovirus-inhibiting constituents from *Zephyranthes candida*. *Pharmaceutical Biology*. 2015, roč. 53, č. 6, s. 882–887.
- [75] LABRAÑA, Josep, Alex King'ori MACHOCHO, Vladimir KRICSFALUSY, Reto BRUN, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*. 2002, roč. 60, č. 8, s. 847–852.
- [76] TSVETKOVA, Dobrina, Danka OBRESHKOVA, Dimitrina ZHELEVA-DIMITROVA a Luciano SASO. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Current medicinal chemistry*. 2013, roč. 20, č. 36, s. 4595–4608.
- [77] BERKOV, Strahil, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008, roč. 18, č. 7, s. 2263–2266.
- [78] SOURMAGHI, Salehi, B. AZADI, Gh AMIN, M. AMINI a M. SHARIFZADEH. The first phytochemical report of *Galanthus transcaucasicus* Fomin. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2010, roč. 18, č. 2, s. 124.
- [79] TORRAS-CLAVERIA, Laura, Strahil BERKOV, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Industrial Crops and Products*. 2013, roč. 43, s. 237–244.
- [80] ELLMAN, George L., K. Diane COURTNEY, Valentino ANDRES a Robert M. FEATHERSTONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961, roč. 7, č. 2, s. 88–95.
- [82] HRSTKA, Václav. Neurotropní a antioxidantní aktivita vybraných druhů jednoděložných alkaloidních rostlin. IV. Hradec Králové 2013. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
- [82] ORTIZ, Javier E., Natalia B. PIGNI, Sebastián A. ANDUJAR, German ROITMAN, Fernando D. SUVIRE, Ricardo D. ENRIZ, Alejandro TAPIA, Jaume BASTIDA a Gabriela E. FERESIN. Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study. *Journal of Natural Products* [online]. 2016, roč. 79, č. 5, s. 1241–1248.
- [83] LEE, Dong Gu, Ah Young LEE, Sun-Ju KIM, Yong-Su JUNG, Dong-Hyouk LEE, Eun Ju CHO a Sanghyun LEE. Antibacterial Phytosterols and Alkaloids from *Lycoris radiata*. *Natural Product Sciences*. 2014, roč. 20, č. 2, s. 107–112.