

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

ALKALOIDY *NARCISSUS* 'DUTCH MASTER' (AMARYLLIDACEAE) A JEJICH
BIOLOGICKÁ AKTIVITA III.

ALKALOIDS OF *NARCISSUS* 'DUTCH MASTER' (AMARYLLIDACEAE) AND
THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY III.

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

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

Hradec Králové, 2017

Kateřina Rýdlová

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a poskytnuté rady. Velké poděkování patří i Mgr. Daniele Hulcové za čas, který se mnou strávila v laboratoři a pomoc při vypracování mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi za stanovení biologických aktivit izolovaných látek, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter. Na závěr nesmím opomenout poděkovat všem pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za ochotu pomoci a poradit při řešení jakýchkoliv situací a za příjemné prostředí, které vytvořili v laboratoři.

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, 2017

.....

Podpis

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. CÍL PRÁCE.....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 <i>Alzheimerova choroba.....</i>	12
3.1.1 Epidemiologie	12
3.1.2 Problém sociální i ekonomický.....	13
3.1.3 Rizikové faktory.....	13
3.1.4 Klinický obraz	15
3.1.5 Diagnostika AD.....	16
3.1.6 Etiopatogeneze	16
3.1.6.1 Cholinergní hypotéza	17
3.1.6.2 β -amyloid a amyloidové plaky	17
3.1.6.3 Hyperfosforylovaný τ -protein	18
3.1.6.4 Apolipoprotein E	18
3.1.6.5 Mitochondriální dysfunkce a oxidační stres.....	19
3.1.7 Terapie Alzheimerovy choroby	19
3.1.7.1 Terapie kognitivních funkcí	20
3.1.7.1.1 Inhibitory cholinesteras	20
3.1.7.1.2 Inhibitory NMDA receptorů	22
3.1.7.1.3 Další možnosti farmakoterapie.....	22
3.1.7.1.4 Potenciální farmakoterapie	24
3.1.7.2 Terapie nekognitivních funkcí	25
3.2 <i>Narcissus 'Dutch Master' (Amaryllidaceae).....</i>	27
3.2.1 Taxonomické zařazení.....	27
3.2.2 Botanická charakteristika.....	27
3.2.2.1 Čeleď Amaryllidaceae.....	27
3.2.2.2 Rod <i>Narcissus</i> L.....	28
3.2.2.3 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.....	28
3.2.3 Lidové léčitelství.....	29
3.2.4 Obsahové látky čeledi Amaryllidaceae a rodu <i>Narcissus</i> L.	29
3.2.5 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	30
3.2.6 Lykorinový strukturní typ	32
3.2.7 Homolykorinový strukturní typ.....	32
3.2.8 Haemantaminový a krinanový strukturní typ	33
3.2.9 Tazettinový strukturní typ.....	34
3.2.10 Pankratistatinový strukturní typ.....	34
3.2.11 Galanthaminový strukturní typ.....	35
3.2.12 Aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae v inhibici AChE.....	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1 <i>Materiál a vybavení pro izolaci</i>	37
4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie	37
4.1.2 Pomocné látky.....	37
4.1.3 Detekční činidla.....	37
4.1.4 Vývíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	38
4.1.5 Adsorbenty pro chromatografii	38

4.1.6	Přístrojové vybavení.....	38
4.1.7	Rostinný materiál.....	38
4.2	<i>Obecné metody</i>	38
4.2.1	Příprava a čištění rozpouštědel.....	38
4.2.2	Odpařování rozpouštědel z extraktů a jejich skladování.....	38
4.2.3	Detekce alkaloidů.....	39
4.2.3.1	Tenkvrstvá chromatografie.....	39
4.2.4	Sloupcová chromatografie.....	39
4.2.5	Příprava preparativních litých TLC desek.....	39
4.3	<i>Izolace alkaloidů z frakce ND 3 – 5 (18 g)</i>	40
4.3.1	Separace alkaloidů z frakce ND 3 – 5/3 pomocí preparativní TLC (638 mg).....	42
4.4	<i>Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů</i>	45
4.4.1	Inhibice AChE a BuChE.....	45
4.4.1.1	Chemikálie.....	45
4.4.1.2	Pufry.....	45
4.4.1.3	Materiál.....	45
4.4.1.4	Přístroje.....	45
4.4.1.5	Podmínky měření.....	45
4.4.1.6	Získávání erytrocytární AChE a BuChE z plazmy.....	46
4.4.1.7	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀).....	46
4.4.2	Stanovení prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity.....	47
4.4.2.1	Chemikálie.....	47
4.4.2.2	Pufry.....	47
4.4.2.3	Přístroje.....	47
4.4.2.4	Podmínky měření.....	47
4.4.2.5	Stanovení.....	48
5.	VÝSLEDKY	49
5.1	<i>Identifikace izolovaných látek</i>	49
5.1.1	Určení struktury (+)-masonin (NDM-1).....	49
5.1.1.1	NMR analýza.....	49
5.1.1.2	MS analýza.....	51
5.1.1.3	Optická otáčivost.....	51
5.1.2	Určení struktury (+)-homolykorin (NDM-2).....	52
5.1.2.1	NMR analýza.....	52
5.1.2.2	MS analýza.....	54
5.1.2.3	Optická otáčivost.....	54
5.2	<i>Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP</i>	54
6.	DISKUSE	55
7.	ZÁVĚR	57
8.	ABSTRAKT	58
9.	ABSTRACT	59
10.	POUŽITÁ LITERATURA	60

PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1 Frakce získané ze sumárního alkaloidního extraktu	40
Tabulka 2 Parametry sloupcové chromatografie spojené frakce ND 3 — 5	41
Tabulka 3 Podmínky preparativní TLC	42
Tabulka 4 Výsledky inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů.....	54

PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> 'Dutch Master'	29
Obrázek 2 Biosyntéza hlavních strukturních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	31
Obrázek 3 Lykorin	32
Obrázek 4 Homolykorin	33
Obrázek 5 Haemanthamin	33
Obrázek 6 Krinin.....	33
Obrázek 7 Tazettin	34
Obrázek 8 Pretazettin	34
Obrázek 9 Narciklasin	35
Obrázek 10 Pankratistatin	35
Obrázek 11 Galanthamin	36
Obrázek 12 Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku.....	41
Obrázek 13 Souhrnný chromatogram separace frakce ND 3 — 5.....	42
Obrázek 14 Chromatogram na skleněné lité TLC destičce	43
Obrázek 15 Srovnávací chromatogram	44
Obrázek 16 (+)-masonin.....	49
Obrázek 17 ¹ H NMR spektrum (+)-masoninu	50
Obrázek 18 ¹³ C NMR spektrum (+)-masoninu	51
Obrázek 19 EI-MS spektrum (+)-masoninu.....	51
Obrázek 20 (+)-homolykorin.....	52
Obrázek 21 ¹ H NMR spektrum (+)-homolykorinu.....	53
Obrázek 22 ¹³ C NMR spektrum (+)-homolykorinu.....	53
Obrázek 23 EI-MS spektrum (+)-homolykorinu	54

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD — Alzheimerova choroba

ACh — acetylcholin

AChE — acetylcholinesterasa

AK — aminokyselina

ApoE — apolipoprotein E

APP — amyloidní prekurzorový protein

β A — β -amyloid

BuChE — butyrylcholinesterasa

CYP — cytochrom P

DMSO — dimethylsulfoxid

DNTB — 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

GC — plynová chromatografie

MF — mobilní fáze

MS — hmotnostní spektrometrie

NMDA — *N*-methyl-D-aspartát

NMR — nukleární magnetická rezonance

NÚ — nežádoucí účinek

POP — prolyloligopeptidasa

RF — rizikový faktor

ROS — reaktivní formy kyslíku

TLC — tenkovrstvá chromatografie

UV — ultrafialová oblast

1. ÚVOD

Dnes díky vědě, vývoji léčiv a očkovacích látek je řada dříve smrtelných nemocí vymýcena, některé jsou téměř potlačeny a mnoho jich umíme léčit. Naše populace však trpí tzv. civilizačními chorobami. Jedná se o komplex chronických neinfekčních onemocnění typických pro rozvinuté země způsobené hlavně životním stylem. Společnost vyrůstá v blahobytu, lidé se dožívají vyššího věku, ale své zdraví dobrovolně poškozují např. nezdravým stravováním a přejídáním, nadměrou alkoholem, kouřením, stresem, sedavým způsobem života atd. Výsledkem nezdravého stylu života je rozvoj civilizačních chorob, mezi které můžeme zařadit rakovinu, aterosklerózu, infarkt myokardu, cévní mozkovou mrtvici, hypertenzi, diabetes mellitus II. typu, obezitu, depresi, Alzheimerovu chorobu, únavový syndrom a další.¹

Alzheimerova choroba patří mezi nejčastější demence. V celkovém trendu populace stárne, prodlužuje se střední délka života a tím narůstá počet nemocí charakteristických právě pro starší věk. Do této skupiny chorob můžeme zařadit demenci, zatím stále nevléčitelnou chorobu.² Současné zdravotnictví dokáže pouze mírnit symptomy a oddálit nástup těžkých stádií. Podstatou onemocnění je pokles hladiny acetylcholinu v mozku a zároveň zvýšení hladiny glutamátu. Stěžejní roli v současné terapii hrají léčiva inhibující enzymy cholinesterasy, která rozkládají acetylcholin. Z této kategorie jsou k dispozici donepezil, rivastigmin a galanthamin. K léčbě těžkých stádií Alzheimerovy choroby se využívá antagonistů *N*-methyl-D-aspartátových receptorů memantin. Terapie této choroby velmi finančně zatěžuje jak stát, tak rodinu a blízké nemocného. Nezbytné je hledání nových léčiv, které by doplnily stávající symptomatickou terapii nebo ještě lépe dokázaly nemoci předcházet.³

Vývoj nových léčiv se ovšem stává stále náročnějším procesem. Může trvat i 15 let a stojí řádově stovky až tisíce milionů dolarů. Léčivo, které se dostane na trh, musí vykazovat výhodnější účinky např. lepší účinek, nižší nežádoucí účinky, nižší toxicitu. Každoročně přichází na trh nespočet léků, ale jen hrstka z nich je opravdovou inovací — látkou s novou strukturou a novým mechanismem účinku. Jinou možností vývoje nového léčiva je obměna chemické struktury. K dalším možnostem hledání potenciálních léčiv patří využití látek rostlinného původu. Právě přírodní léčiva,

jejichž užívání vycházelo ze zkušeností z lidového léčitelství, tvoří nejdelší etapu v historii vývoje léčiv.⁴ Galanthamin je příkladem léčiva rostlinného původu, které je stále považováno za stěžejní v terapii Alzheimerovy choroby. Další přírodní látkou, která má využití v léčbě dané choroby je huperzin A.

Hledáním potenciálně využitelných přírodních látek k terapii Alzheimerovy choroby se zabývá také katedra farmaceutické botaniky a ekologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Na této katedře se věnují vyhledávání vhodných zdrojů biologicky aktivních látek, následně izolací obsahových látek, popisem jejich struktury a určením jejich inhibiční aktivity vůči vybraným enzymům, které představují terapeutické cíle u této nemoci. Jedním z vytipovaných zdrojů se stal také *Narcissus 'Dutch Master'*. Náplní mé práce je izolace obsahových látek z přidělené rostliny, popis jejich struktury a biologické aktivity.

2. CÍL PRÁCE

1. Izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě z vybrané frakce získané z chromatografické separace sumárního alkaloidního extraktu z *Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae).
2. Podíl na určení struktury izolované sloučeniny (GC-MS, NMR analýza, stanovení optické otáčivosti).
3. Podíl na stanovení biologické aktivity izolovaných látek vůči lidským cholinesterasám a prolyloligopeptidase.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) byla pojmenována podle lékaře Aloise Alzheimer, který jako první popsal toto onemocnění. Na schůzi jihoněmeckých psychiatrů v Tübingeru přednášel o případu jednapadesátileté paní Augusty D., která zemřela na těžkou demenci.⁵

AD je nazývána také jako Alzheimerova demence a patří mezi nejčastější formy demence.⁶ Udává se, že tvoří zhruba 50 — 70 % všech demencí.⁷ AD spadá konkrétně do kategorie atroficko-degenerativní demence. Dalším typem je ischemicko-vaskulární demence vzniklá na podkladě cévního poškození mozku. Třetím typem je symptomatická (sekundární) demence. Jedná se o postižení mozku vyvolané jiným onemocněním např. úrazem, intoxikací apod. Demence obecně se vyznačuje úbytkem kognitivních (poznávacích) funkcí jako jsou paměť, intelekt, pozornost a motivace. Jak onemocnění graduje, bývá postižena i emotivní stránka a mohou se vyskytovat např. deprese, bludy či halucinace. Pacient je postupem času zcela odkázán na pomoc druhé osoby.^{8,9} Příznaky AD se vyvíjí pozvolna a klíčovým okamžikem je včasná diagnostika a záchyt onemocnění.⁵

3.1.1 Epidemiologie

AD je onemocnění, které se vyskytuje převážně u starších lidí, nejčastěji po 65. roce, a proto vlivem stárnoucí populace počet nemocných touto chorobou rapidně narůstá.⁵ AD můžeme rozdělit na formu s časným začátkem, tzv. presenilní, projevující se již před 65. rokem života. Frekventovanějším typem je AD s pozdním začátkem, u které se první příznaky objevují po 65 roce. Presenilní forma se většinou velmi rychle zhoršuje, zatímco pozdní demence progreduje podstatně pomaleji a typickým rysem je výrazné zhoršení paměti.¹⁰ Ve vyšším věku se ženy stávají ohroženější skupinou než muži.⁵ U lidí starších 65 let je četnost demence zhruba 5 — 8 %. Mezi lidmi staršími 75 let se počet nemocných vyšplhá na 15 — 20 %. V kategorii nad 85 let demence postihuje až 25 — 50 % populace.¹¹ Výskyt AD úzce souvisí také s životním stylem a finančním příjmem jedinců. V současné době je na světě více než 35 milionů lidí

trpících demencí. Z nich více než polovina jsou obyvatelé ze zemí s nižším až nízkým příjmem.¹² Podle odhadů se v roce 2050 toto číslo zvýší ze současných 58 % až na 68 %.¹³

Studie dokazuje, že u osob s nedokončenou nebo prodlouženou školní docházkou, se AD objevovala častěji.⁶ V České republice se odhaduje asi 135 tisíc případů demencí, z nichž 2/3 zaujímá právě AD.¹⁴ Do budoucna se odhaduje, že se AD bude vyskytovat v populaci stále častěji. V roce 2050 se počet případů zčtyřnásobí až na 106,8 mil.¹⁵

3.1.2 Problém sociální i ekonomický

AD znamená zátěž pro zdravotnictví, pacienta, rodinu a z hlediska financí i pro společnost. Péče o nemocného je velmi vyčerpávající a také finančně náročná. Asociace Alzheimer Europe provedla výzkum. V roce 2006 — 2008 zdravotnická zařízení utratila více než 50 miliard eur ročně, aby poskytla kvalifikovanou péči nemocným s AD. K tomuto číslu je nutné ještě připočítat více než 70 miliard eur. Tuto sumu ročně vynaloží rodina a blízcí příbuzní, kteří se o nemocné starají.¹⁴

3.1.3 Rizikové faktory

Příčina AD není zcela objasněna. Existují ale rizikové faktory (RF), které mohou přispět k rozvoji nemoci. AD úzce souvisí s pohlavím a věkem, jak už bylo zmíněno výše. Mezi další RF patří také genetická predispozice. Výskyt nemoci v dřívějším věku okolo 30 až 40 let většinou souvisí s rodinou zátěží.¹⁵ Jedná se o familiární formu AD, jejíž četnost v populaci není příliš vysoká (5 — 10 %).¹⁶ U těchto pacientů se vyskytují změny na 1., 14. a 21. chromosomu.¹⁵ Poškození 21. chromosomu způsobuje zvýšenou produkci β -amyloidu (β A), který je přítomen v mozku všech pacientů s AD.^{8,17} U starších pacientů s AD bez rodinné zátěže hraje významnou roli změna na 19. chromosomu,¹⁵ který kóduje apolipoprotein E (ApoE), jehož kumulace v mozku se zvyšuje při onemocněních nebo úrazech centrálního nervového systému.¹⁸ Tento druhý typ se nazývá sporadická forma AD a její výskyt v populaci převládá (90 — 95 %).¹⁶

Určitým RF pro vznik AD může být dosažení nižšího vzdělání. Naopak za protektivní je považováno vyšší vzdělání a tedy více trénovaný a zatěžovaný mozek. Výsledky studií se však zcela neshodují. Výskyt AD u lidí se základním vzděláním může souviset také s nižší životní úrovní, finančním příjmem a častějším výskytem alkoholové demence.⁶

Kromě pohlaví a genetiky se na propuknutí AD podílí také vnější vlivy. Jedním z nich je kouření. S kouřením cigaret je spojena celá řada onemocnění. Kouření způsobuje např. kardiovaskulární choroby, nemoci dýchacích cest jako jsou chronická obstrukční plicní nemoc, astma nebo rakovina plic. Možná překvapivě se ale může podílet i na vzniku AD. Ačkoliv dřívější studie prosazovaly, že kouření naopak chrání před vznikem AD, dnešní výzkum tento fakt jednoznačně vyvrací a kouření je považováno za významné riziko AD.¹⁹

Dalším kontroverzním tématem je hliník. Dlouhodobé vystavení hliníku bylo spojováno s jeho neurotoxickými účinky. Byl podezříván, že způsoboval tvorbu změněného τ -proteinu, který následně vedl k produkci neuronálních klubek. Nové studie však nevidí spojení mezi hliníkem a AD.^{6,20}

S výskytem AD byl zkoumán i zinek. V nízkých dávkách je zinek pro tělo důležitý, ve vysokých dávkách může působit naopak neurotoxicky. Některé studie popisovaly, že vysoké koncentrace zinku mohou způsobovat agregaci β -amyloidního proteinu (β A) a jeho kumulaci v poškozených neuronech.⁶

Řada studií se zabývala zjištěním, zda poranění mozku, při kterém dojde ke ztrátě paměti nejméně na 15 min., může přispět k rozvoji AD. Výsledky těchto studií nebyly zcela jednotné. Některé studie dokazovaly, že v důsledku poranění mozku vznikají patologické proteiny, které jsou podkladem pro vznik AD a následně se šíří buňkami mozku.²⁰ Jiné studie toto tvrzení vyvracely.

Důležitou roli hraje také výživa. V dětství jsou nezbytné vitaminy (B12, C), minerály, aminokyseliny a omega-3-mastné kyseliny, které jsou zodpovědné za správný vývoj mozku. Podvýživa může zapříčinit vyšší náchylnost k acetylcholinu. Výživu nesmíme podcenit ani v dospělosti, neboť její nedostatek může akcelarovat nástup AD.²¹

3.1.4 Klinický obraz

Nemoc se vyvíjí velmi nenápadně a pozvolna. Celý tento proces může trvat 8 až 20 let podle zdravotního stavu pacienta. Manifestaci onemocnění navíc předchází latentní období.^{22,23} U demencí dochází k postižení tří základních složek osobnosti. Zaprvé kognitivní funkce, zadruhé aktivity denního života a zatřetí chování, emotivita, a další pro které se souhrnně používá pojem behaviorální a psychologické symptomy demence.²⁴ Nejčastěji se AD dělí do tří stádií.

V počátečním stádiu AD bývá jako první výrazně postižena krátkodobá paměť v důsledku odumírání mozkových buněk. Pacient není schopen si zapamatovat nové věci. Hledá nedávno uložené věci, zatímco dlouhodobě vštípené zážitky má relativně zachovalé. V tomto stádiu se mohou objevovat problémy s orientací. Pacient se ztrácí nejprve ve větších prostorech (např. hromadná doprava), později bloudí i ve vlastním bytě. Upadá zájem o záliby a přátele. Dalším rysem v této fázi je porucha řeči. Dotyčný může mít problém s vybavením si běžných slov nebo jmen.

Pro střední stádium (mírnou formu) AD je typická výrazná porucha paměti. Pacient si nevybavuje, co nedávno dělal, jména příbuzných ani svou adresu. Nové informace si zafixuje jen velmi těžce a pouze na krátkou dobu. Je dezorientovaný a jeho soběstačnost velmi upadá.

V těžkém stádiu onemocnění pacienti nepoznávají své blízké, zaměňují je za jiné. Nejsou schopni bez pomoci vykonávat běžné denní aktivity např. oblékání, hygienu, stravování. Často trpí inkontinencí moči i stolice. Slovní zásoba upadá. Mohou se objevit palilálie a logoklonie (stálé opakování částí slov nebo koncovek). V různém stádiu nemoci dochází k poruchám chování a emoční labilitě. Mohou se objevit deprese, úzkost, agresivita, halucinace či bludy. U některých zástupců se rozvinou extrapyramidové syndromy — poruchy chůze, rigidita, pády, dokonce i epileptické záchvaty. Toto stádium vyústí ke smrti nemocného.^{23,25,26,27}

3.1.5 Diagnostika AD

AD patří mezi nevyléčitelné choroby, přesto je správná a rychlá diagnóza onemocnění nesmírně důležitá. Umožní včas zahájit správnou léčbu, a tak oddálit nástup onemocnění.²⁸

V praxi se diagnóza AD provádí pokud pacient trpí progresivní ztrátou paměti déle než 6 měsíců. Současně mu toto zhoršení znemožňuje postarat se sám o sebe, zhoršuje kontakt s lidmi a pracovní výkon. Jako rychlý test k objektivnímu zhodnocení kognitivních funkcí je možné využít např. Mini-Mental State Examination.²⁹ K diagnostice se stále nejvíce využívají kritéria sestavená v roce 1984 NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders — Alzheimer's Disease and Related Dementias Association), která hodnotí paměť, řeč, vnímání, pozornost, konstrukční dovednosti, orientaci, řešení problémů a schopnost normálního fungování. Podle výsledků sledovaných parametrů se diagnóza dělí na pravděpodobnou, možnou, nepravděpodobnou nebo jistou.²⁸ Pro zpřesnění diagnózy se provádí ještě hodnocení aktivity denního života, poruchy nálad a chování.³⁰ Aby byla diagnóza AD definitivní, musí být výsledek testu podložen biopsií či pitvou.³¹ K odlišení léčitelných příčin demence se využívají pomocné vyšetřovací metody, mezi které patří vyšetření štítné žlázy, EKG, rtg plic, počítačová tomografie nebo magnetická rezonance mozku. Počítačová tomografie dokáže odhalit strukturální příčiny demence jako jsou např. tumor, subdurální hematoma, ischemická léze atd. Novější metody jako pozitronová emisní tomografie a jednofotonová emisní tomografie informují o metabolismu mozku a napomohou ke včasné diagnóze ještě než dojde k zániku neuronů.^{32,23}

3.1.6 Etiopatogeneze

U AD probíhají změny podobné stárnutí. Dochází ke zmenšování hmotnosti a objemu mozku, snižuje se tloušťka mozkové kůry, rozšiřují se mozkové komory. Tyto projevy jsou ale u AD mnohem rychlejší a markantnější. Více nápadné se tyto změny jeví u presenilní formy do 60 — 65 let než u pozdní formy AD. Během stárnutí se neurony postupně zmenšují, zatímco u AD ubývají. Nejpostiženější oblastí u AD je

spánkový lalok.³³ Důvod zániku neuronů není přesně znám, jedná se pravděpodobně o kombinaci více vlivů. Vznik AD popisuje několik hypotéz.

3.1.6.1 Cholinerní hypotéza

Acetylcholin (ACh) hraje významnou roli v centrálním i periferním nervovém systému. Ovlivňuje řadu fyziologických funkcí jako jsou pozornost, učení, paměť, bdění a spánek, smyslové informace nebo stresové reakce.³⁴ Syntéza ACh probíhá v neuronech z cholinu a acetylkoenzymu A enzymem acetylcholintransferasou.³⁵ U AD je koncentrace tohoto enzymu snížena.²⁶ Následně může ACh ovlivňovat muskarinové a nikotinové receptory jako neurotransmitter nebo může vystupovat jako neuromodulátor a způsobit excitaci nebo inhibici vzdálenějších neurotransmitterových systémů. Rozklad ACh v centrálním nervovém systému zajišťuje enzym acetylcholinesterasa (AChE),³⁶ zatímco na periférii katalyzuje rozklad enzym butyrylcholinesterasa (BuChE), který je strukturně a funkčně podobný AChE.³⁷ Cholinerní hypotéza předpokládá narušení vstupu acetylcholinu do neuronu, poškození jeho syntézy i uvolňování.²⁶ Kvůli nedostatku ACh a snížené aktivaci cholinerních receptorů pravděpodobně dochází k fosforylaci amyloidních prekurzorových proteinů (APP), které podporují vznik β A a následně vznik amyloidních plaků.³⁶ Stupeň postižení kognitivních poruch odpovídá snížené hladině acetylcholintransferasy a sníženému množství nikotinových receptorů. Muskarinové receptory zůstávají relativně zachovalé.²³ Postupně dochází i k narušení dalších systémů neurotransmitterů, především glutamerního, což sníží schopnost si zafixovat nové paměťové stopy.³⁸

3.1.6.2 β -amyloid a amyloidové plaky

Kromě cholinerní teorie se vznik AD často popisuje pomocí amyloidové kaskády.¹⁶ β A je protein, který se skládá z 38 — 43 aminokyselin (AK).³⁹ Vytváří se z APP, který je hojně zastoupený kolem synapsí. Jeho funkce není zcela objasněna, pravděpodobně ale hraje významnou roli v plasticitě neuronů a má neuroprotektivní efekt.⁴⁰ Za fyziologických podmínek je β A štěpen tzv. neamyloidní cestou enzymem α -sekretasou. Vznikají krátké fragmenty s délkou do 39 AK, které jsou dobře

rozpustné.⁴¹ Za patologických podmínek je APP štěpen β - a γ -sekretasou tzv. amyloidní cestou na delší fragmenty βA_{1-40} a βA_{1-42} .⁴⁰ Tyto fragmenty nejsou rozpustné, srážejí se v extracelulárním prostoru, polymerují a vzniká βA .³⁸ Agregace a kumulace βA v CNS vede k tvorbě senilních amyloidních plaků. V blízkosti plaků dochází k zániku synapsí, degenerativním procesům až odumření neuronů. Dále dochází k aktivaci sterilní zánětlivé reakce, včetně aktivace cyklooxygenasy II, k uvolnění volných kyslíkových radikálů, excitačních AK, cytokinů atd., které vedou k dalšímu neurodegenerativnímu poškození.^{23,42} Konečným výsledkem je zánik neuronů důsledkem programované buněčné smrti (apoptózy).¹⁶

3.1.6.3 Hyperfosforylovaný τ -protein

Dalším mechanismem, který popisuje vznik a rozvoj AD, je hyperfosforylace τ -proteinu.¹⁶ τ -protein je s mikrotubuly asociovaný protein. Nachází se přímo v neuronech, váže se na povrch mikrotubulů a stabilizuje je.⁴³ U AD a dalších tautopatiích je τ -protein patologicky změněn. Dochází k jeho hyperfosforylaci a shlukování do párových helikálních vláken nebo do rovných filament. Výsledkem jsou neurofibrilární klubka tzv. tangles, která jsou toxická pro neurony.⁴⁴ Neurony obsahující neurofibrilární klubka nedokážou plnit svou funkci a zanikají.³⁸

3.1.6.4 Apolipoprotein E

ApoE je protein, který se podílí na metabolismu lipidů. Jeho funkcí je zprostředkovat přenos lipidů mezi buňkami a tkáněmi. ApoE se vyskytuje ve 3 izoformách: ApoE2, ApoE3, ApoE4, které se objevují v populaci s různou frekvencí — ApoE3 77,9 %, ApoE2 8,4 % a ApoE4 13,7 %.⁴⁵ Zatímco ApoE3 je běžně se nacházející forma, alela ApoE2 je spojena s hyperlipoproteinémií typu III, která může vést ke kardiovaskulárním onemocněním. Pacienti, u nichž je detekována alela ApoE4, mají vyšší riziko neurodegenerativních onemocnění.⁴⁶ V CNS je ApoE syntetizován převážně astrocyty. V periferním nervovém systému zastávají tuto funkci gliové buňky v nemyelizovaných Schwannových buňkách. Studie ukázaly, že ApoE se spolu s βA ukládá v senilních placích. Podporuje rychlejší a vyšší ukládání βA v senilních placích. Kumulace βA v arteriích, arteriolách i kapilárách může vést k cerebrální amyloidní

angiopatii.⁴⁵ Nejvíce bývá postihnuta týlní kůra. Výskyt angiopatie roste s věkem a zároveň odpovídá množství senilních plaků. U pacientů s AD se nachází až u 80 % — 90 % případů.³³

3.1.6.5 Mitochondriální dysfunkce a oxidační stres

Výše zmíněné senilní plaky a neuronální klubka jsou spojeny se zvýšeným oxidačním stresem.⁴⁷ Oxidační stres nastává pokud je narušena rovnováha mezi tvorbou a eliminací reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS jsou reaktivní molekuly obsahující kyslík a jsou produkovány ve všech aerobních buňkách. Organismy si ale vyvinuly obranné mechanismy. Nadměrná produkce ROS způsobuje oxidaci makromolekul — DNA, proteinů, sacharidů, lipidů, které následně ztrácí svou funkci.⁴⁸

AD jako většina neurodegenerativních onemocnění je spojena s poruchami mitochondrií. Ty hrají klíčovou roli v regulaci apoptózy, která se podílí na procesu stárnutí.⁴⁷ Samotné stárnutí je spojováno se zvýšenou produkcí ROS mitochondriemi.⁴⁹ Poškozené mitochondrie se stávají většími producenty ROS, ale méně účinnými producenty adenosintrifosfátu, což vyústí ke zhoršení energetického metabolismu.^{50,51} Snížený energetický metabolismus mozku je jedním z nejlépe dokumentovaných abnormalit u AD.⁵¹

3.1.7 Terapie Alzheimerovy choroby

Jelikož patogeneze AD není ještě zcela objasněna, není dosud možná kauzální léčba. Současná terapie zahrnuje kombinaci farmakoterapie s dalšími nefarmakologickými přístupy.²⁶ Cílem je vytvořit vždy léčbu vyhovující přesně danému pacientovi. Nefarmakologické metody by měly pečovat o celkový stav nemocného. Důležitá je strava, hydratace, pohybová aktivita a správná léčba přidružených onemocnění. Pro zachování paměti hraje velkou roli kognitivní trénink. Kromě péče o nemocné je také důležité se věnovat vzdělávání a psychologické podpoře osob, které se o pacienty s AD starají.^{16,52,23}

Farmakoterapie lze obecně dělit na dvě základní skupiny: na terapii kognitivních a nekognitivních funkcí.²⁶

3.1.7.1 Terapie kognitivních funkcí

V kognitivní terapii se uplatňují hlavně dvě skupiny léčiv ovlivňující acetylcholinergní a glutaminergní systém. Jejich účinnost je doložena dle studií založených na důkazech. Jedná se o inhibitory acetylcholinesteras a parciální inhibitory NMDA (*N*-methyl-D-aspartátových) receptorů.^{16,52} Užívání kognitiv může vést ke zlepšení kognitivních funkcí obvykle na dobu 6 — 12 měsíců. Prodlouží se tak období aktivního života pacienta, oddálí se progresse onemocnění a propuknutí nejtěžšího stádia nemoci.⁵²

3.1.7.1.1 Inhibitory cholinesteras

Inhibicí AChE docílíme nižšího odbourávání acetylcholinu, který je schopen se ve vyšší míře navázat na muskarinové a nikotinové receptory.²³ Inhibitory cholinesteras patří v současné době k nejúčinnější terapii. Kromě kognitivních funkcí ovlivňují i nekognitivní funkce nejčastěji apatii, bludy, podrážděnost či úzkost, které se v průběhu progresse nemoci objevují.³⁶ Tato skupina léčiv je efektivní u všech druhů demence s výjimkou frontotemporální. Největší benefit je sledován u lehkých až středně těžkých forem.

Inhibitory AChE jsou většinou pacienti dobře snášeny. Mezi nejčastější nežádoucí účinky (NÚ) patří gastrointestinální obtíže např. nechutenství, nevolnost, úbytek váhy, zvracení či průjem. Méně se pak vyskytuje nespavost, bolest hlavy, křeče nebo močová inkontinence. Zpravidla se tyto NÚ projevují na počátku léčby nebo se zvýšením dávky. NÚ lze alespoň částečně snižovat podáváním léků s jídlem, postupnou titrací dávek nebo užitím jiné než perorální formy.^{52,53}

Prvním objeveným léčivem z této skupiny byl takrin. Jednalo se o reverzibilního inhibitora AChE, který patří mezi akridinové deriváty. Vysokou účinnost však převýšila značná hepatotoxicita. Proto byl takrin stažen a dále se již v praxi neužívá.^{36,25}

Donepezil je piperidinový reverzibilní inhibitor AChE. V současnosti nejvíce předepisovaný a obecně velmi dobře snášený. Díky dlouhému biologickému poločasu eliminace (až 70 hod) ho můžeme podávat jen v jedné denní dávce. Obvyklá denní dávka činí 5 mg, kterou lze po 1 — 2 měsících zvýšit až na 10 mg denně. Dostupný je ve formě potahovaných a nově i dispergovaných tablet, které jsou vhodné u pacientů

s poruchou polykání.^{54,55} Hlavní cesta metabolismu donepezilu vede přes cytochrom P (CYP) izoformy 3A4 a 2D6 v játrech. Proto může dojít k interakci při současném podání silných inhibitorů jako jsou cimetidin, ketokonazol, paroxetin, fluoxetin a fluvoxamin. Výsledkem této inhibice je zvýšení koncentrace donepezilu.⁵⁶

Rivastigmin patří mezi karbamátové deriváty stejně jako fysostigmin. Fysostigmin má ale velmi krátký poločas, mnoho NÚ a jeho užívání je omezeno jen na experimentální účely. Mechanismus účinku rivastigminu spočívá v pseudoireverzibilní inhibici, což znamená, že je odbouráván přímo molekulou cholinesteras. Jako jediný zástupce působí i na inhibici BuChE. Na rozdíl od donepezilu, vykazuje nižší vazbu na plazmatické bílkoviny (cca 40 %) i kratší biologický poločas (1 — 2 hod). Metabolismu se neúčastní enzymatický systém CYP 450, proto nedochází na této úrovni k interakcím. Vylučován je ledvinami. Obvyklá dávka činí 6 — 12 mg, která je rozložena do dvou denních dávek.^{23,25,53,55} Pacienti užívající rivastigmin trpí častěji gastrointestinálními NÚ. Lepší snášenlivost než tablety umožňuje nová léková forma transdermální náplasti.^{55,56}

Galanthamin je terciální fenanthrenový alkaloid. Poprvé byl izolován z cibulí sněženky *Galanthus woronowi* Losinsk. Obsah galanthaminu byl ale detekován i v jiných rodech čeledi Amaryllidaceae např. *Narcissus* L., *Nerine* Herb., *Lycoris* Herb., *Leucojum* L. atd. Kvůli možnosti nízkého výtěžku z rostlinných zdrojů, lze galanthamin připravit též umělou syntézou.^{57,58} Galanthamin působí dualistickým účinkem. Reverzibilní selektivní kompetitivní inhibici AChE doplňuje alosterická modulace presynaptických i postsynaptických nikotinových receptorů, což vede ke zvýšení cholinergní transmise.^{23,58} Po perorálním podání se velmi rychle vstřebává. Studie dokázaly, že při současném podání s jídlem není ovlivněna celková dostupnost, ale zpomaluje se absorpce.⁵⁷ Na plazmatické bílkoviny se váže z cca 20 %. Metabolizován je prostřednictvím jaterních enzymů CYP 3A4 a 2D6. Současné podání s inhibitory těchto izoform se stejně jako u donepezilu nedoporučuje. Podává se jednou až dvakrát denně v dávce 16 — 24 mg/den.^{56,58} Vyšší dávky již nemají vliv na zlepšení kognitivních funkcí.⁵⁷

Huperzin A je lykodinový alkaloid poprvé izolován z čínské rostliny *Huperzia serrata* Thunb (Huperziaceae). V terapii AD se uplatňuje jako selektivní reverzibilní

inhibitor AChE. Zároveň působí i jako antagonist NMDA receptorů.⁵⁹ Tento efekt snižuje excitotoxicitu a buněčnou smrt, která je způsobena nadměrným drážděním těchto receptorů glutamátem.⁶⁰ *Huperzia serrata* Thunb je v tradiční čínské medicíně hojně používána jako antipyretikum a antiflogistikum např. k léčbě otoků, schizofrenie, myastenia gravis nebo otravě organofosfáty.⁶¹ Huperzin A tyto účinky postrádá. Vykazuje však neuroprotektivní vlastnosti. Zlepšuje paměť a učení.⁶² Mezi další účinky patří i ochrana před volnými radikály. Při orálním podání prostupuje díky své vysoké lipofilitě rychle a snadno přes hematoencefalickou bariéru. Navíc oproti jiným zástupcům je efektivnější. Po podání huperzinu A se hladina acetylcholinu zvýší 2x – 8x více a tento efekt je déletrvajícím.⁶⁰

3.1.7.1.2 *Inhibitory NMDA receptorů*

NMDA receptory patří do rodiny ionotropních glutamátových receptorů. Jedná se o ligandem řízené iontové kanály. Ligandem pro NMDA receptor je glutamát, hlavní excitační neurotransmitter, a glycin. Za fyziologických podmínek je NMDA receptor blokován Mg^{2+} nebo Zn^{2+} ionty. Po uvolnění glutamátu dojde k depolarizaci, vstupu Na^+ a v menší míře i Ca^{2+} iontů dovnitř a výstupu K^+ ven z buňky.⁵⁶ Vstup Ca^{2+} je nezbytný pro učení a vytváření dlouhodobé paměti a zajištění plasticity synapsí.^{63,25} Oproti tomu u AD dochází k nadměrnému uvolnění glutamátu. To vede ke zvýšené kumulaci Ca^{2+} uvnitř neuronů, rozvratu vnitřního prostředí, hyperexcitaci a poškození neuronů.⁵³

Memantin je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, který je užíván v monoterapii nebo v kombinaci s donepezilem k terapii střední až těžké formy AD.⁶³ Po orálním podání je biologická dostupnost téměř 100 %. Maximální denní dávka dosahuje 20 mg. Důležitá je postupná titrace během prvních 3 týdnů.⁵⁶ Mezi možné NÚ, které se ovšem vyskytují jen velmi vzácně, patří závratě, únava, bolest hlavy nebo obstrukce.⁵²

3.1.7.1.3 *Další možnosti farmakoterapie*

Používání těchto léčiv není založeno na důkazech. Většinou se užívají v kombinaci a jejich účinek je spíše podpůrný.

3.1.7.1.3.1 Prekurzory acetylcholinu

ACh v léčbě AD nemá kvůli svému krátkému poločasu žádný význam. Stejně tak cholin jako prekurzor ACh nemá dostatečný efekt. Navíc vykazuje depresogenní

působení. Nejužitečnější se dle studií prokázalo podávání lecitinů. Vhodným zdrojem jsou sojové boby a z nich lisovaný sojový olej, jelikož kromě lecitinu obsahuje i nenasycené mastné kyseliny — linolovou, olejovou a linolenovou. Pro dostatečný efekt je nutné podávat vysoké denní dávky lecitinu — až desítky gramů. I přesto nejsou výsledky příliš uspokojivé a v praxi se lecitiny nejčastěji kombinují s inhibitory AChE.^{25,6}

3.1.7.1.3.2 Extrakt *Ginkgo biloba* EGb 761

Standardizovaný extrakt z listů jinanu dvoulaločného EGb 761 obsahuje flavonové glykosidy, které inaktivují volné kyslíkové radikály.⁵⁹ Další složku tvoří terpenové laktony (gingkolidy a bilobalidy) a organické kyseliny. Ginkgolidy mají především hemodynamický efekt. Inhibují faktor aktivující krevní destičky, zatímco bilobalidy jsou nositelem neuroprotektivního účinku. Předpokládá se, že další významné účinky extraktu jsou protizánětlivé a antiapoptotické. Extrakt pravděpodobně také zabraňuje tvorbě β A a zvyšuje množství některých transmiterů v mozku.⁶⁴ EGb 761 lze nasadit jako prevenci, při kontraindikaci nebo nesnášenlivosti inhibitorů AChE. Důležité je dodržet denní dávku, která by měla dosahovat 240 mg.⁵²

3.1.7.1.3.3 Zhášedce volných kyslíkových radikálů

ROS, které jsou při AD v nadbytku, způsobují peroxidaci lipidů, poškození membrány neuronů a vedou až k jejich zániku. K likvidaci ROS se využívají antioxidanty, mezi které patří např. vitamin C, vitamin E, retinol, nootropikum pyritinol nebo meklofenoxát.²⁵

3.1.7.1.3.4 Nootropika

Takto se nazývají látky, které zlepšují kognitivní funkce a to především paměť a učení.²⁵ Podporují oxidativní metabolismus glukosy, neuronální proteosyntézu a chrání nervovou tkáň proti hypoxii.⁶ Do této skupiny řadíme piracetam a jeho deriváty, pyritinol, dihydrované námelové alkaloidy a od nich odvozený derivát nicergolin, dále výše zmíněný meklofenoxát a extrakt z *Ginkgo biloba* L. Výhodou piracetamu je zvyšování plasticity erytrocytů.²⁵

3.1.7.1.3.5 Nervové růstové faktory

Studie prokázaly, že nervová tkáň si dokáže sama produkovat nervové růstové faktory, které se uplatňují např. v tvorbě synapsí. Prekurzorem nervových růstových faktorů je cerebrolysin. Jedná se o směs AK a krátkých peptidů. Dalším potenciálně

využitelným léčivem je selegilin — inhibitor monoaminoxydasy B, který působí *in vitro* jako nervový růstový hormon.

U postmenopauzálních žen je nezbytná substituce estrogeny. Estrogeny vedou také k uvolnění nervových růstových hormonů a zajišťují lepší průtok krve mozkovou tkání.^{23,25}

3.1.7.1.3.6 Ostatní možnosti

Mezi další možné přístupy k terapii kognitivních poruch patří nesteroidní antiflogistika. Zabraňují ukládání β A v mozku a působí protizánětlivě. Jelikož mozek pacientů s AD bývá postižen sterilním zánětem, jsou antiflogistika považována za protektivní.^{6,36}

Pro zlepšení krevního zásobení mozkové tkáně se používají vazodilatancia — naftidrofuryl, pentoxyfilin a apovinkamin, alkaloid izolovaný z *Vinca minor* L. Jelikož u AD je porušena homeostáza vápníku používají se blokátory kalciových kanálů. Kromě memantinu, který patří do skupiny inhibitorů závislých na receptorech, se používají ještě inhibitory závislé na potenciálu neuronové membrány. Do této skupiny patří nimodipin, cinnarizin a flunarizin.²⁵

3.1.7.1.4 Potenciální farmakoterapie

Pacientů trpících AD přibývá a terapie se zdá stále značně omezená. Neexistují totiž látky, které by dokázaly chorobu vyléčit nebo jí předcházet. Proto je přikládán velký význam současnému vývoji nových léčiv. Kromě sloučenin zasahujících do cholinergní hypotézy se intenzivně studují např. látky ovlivňující tvorbu a agregaci β A. Jak již bylo zmíněno, za tvorbu β A jsou zodpovědné β - a γ -sekretasy, které chybně štěpí APP. Jejich modulací nebo inhibicí by mohlo dojít ke snížení tvorby β A, následně k redukci amyloidních plaků a odumírání neuronů. Perspektivní se zdálo užití vakcinace proti β A. Testování však muselo být v 2. fázi klinického vývoje léčiv zastaveno pro detekci závažného NÚ postvakcinační encefalitidy. Nadějná se zdají léčiva inhibující β -sekretasu. Vyznačují se relativně dobrou tolerancí a aplikací per os. Další možný přístup k terapii znamenaly inhibitory APP fenserin a deferoxamin. Bohužel v klinické praxi nepřinesly žádný účinek. Zkoumány jsou také aktivátory α -sekretas, látky ovlivňující mitochondriální funkce, modulující ukládání τ -proteinu, zabraňující hyperfosforylaci a mnohé další.³

Další možnou strategií v léčbě AD je imunizace proti β A. Pasivní imunizací by mělo dojít k vytvoření protilátek proti β A. V klinickém testování se nachází například gantenerumab a solanezumab. U těchto léčiv se předpokládá vyšší účinek u časného stádia nemoci.³

V posledních letech se významným cílem v léčbě AD stala prolyloligopeptidasa (POP). Jedná se o cytosolovou serin peptidasu, která štěpí peptidy na karboxylovém konci serinu. Bylo prokázáno, že POP se hojně vyskytuje v mozku. Podílí se na procesu učení, paměti, diferenciaci a dělení buněk. Mimo jiné je spojována také s psychiatrickými poruchami jako je schizofrenie, bipolární afektivní porucha a neurodegenerativními poruchami včetně AD. Výzkum je proto zaměřen na inhibitory POP. V experimentech na zvířatech byly dokonce prokázány neuroprotektivní účinky a pozitivní vliv na zvýšení kognitivních funkcí.⁶⁵

3.1.7.2 Terapie nekognitivních funkcí

Pro komplexní péči o pacienta je důležité zaměřit se také na doprovodné příznaky, které se v průběhu AD projeví, zhoršují stav nemocného a komplikují léčbu.

Při terapii deprese jsou první volbou inhibitory zpětného vychytávání serotoninu — fluvoxamin, fluoxetin, citalopram, sertralin. Vhodné jsou také inhibitory monoaminoxidasy A. V praxi se však uplatňuje jen jediný zástupce moklobemid.²⁵ Obě skupiny mohou mít pozitivní vliv i na agitovanost pacientů.³⁶ Naprosto nevhodná jsou u AD tricyklická antidepresiva např. imipramin, amitryptilin. Vzhledem k jejich silnému anticholinergnímu účinku mohou způsobit zácpu, sucho v ústech, tachykardii a hlavně zhoršení paměti.^{8,25}

Pacienti s AD často trpí agitovaností, neklidem, poruchou vnímání až paranoiou. K potlačení těchto příznaků se používají antipsychotika (neuroleptika). Klasická antipsychotika ovlivňují kromě dopaminergního také anticholinergní a serotoninergní systém. Vykazují tedy širší škálu NÚ. Výjimečně se k terapii těžko zvládnutelného neklidu používá pacienty poměrně dobře tolerovaný haloperidol. Z této skupiny je možné využít i melperon. Dnes se dává přednost spíše novějším látkám tzv. atypickým antipsychotikům. Zejména se využívá tiaprid, risperidon a olanzapin. Tyto látky se mohou použít i k léčbě nespavosti.^{8,25,26}

Při nespavosti jsou preferována nebenzodiazepinová hypnotika zolpidem a zopiklon. Mezi jejich výhody patří nízký potenciál závislosti při dlouhodobém a pravidelném užívání. Při rychlém vysazení nevyvolávají rebound fenomén.^{8,25}

3.2 *Narcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae)

Český název: Narcis žlutý

3.2.1 Taxonomické zařazení⁶⁶

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Liliopsida

Podtřída: Lilidae

Řád: Asparagales

Čeleď: Amaryllidaceae

Rod: *Narcissus* L.

Druh: *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master

3.2.2 Botanická charakteristika

3.2.2.1 Čeleď Amaryllidaceae

Do čeledi Amaryllidaceae (Amarylkovitých) patří asi 60 rodů (850 druhů) rozšířených po celé planetě. Nejvíce se vyskytují v tropickém a subtropickém pásu.⁶⁷

Jedná se o vytrvalé byliny s podzemní cibulí méně často oddenky nebo cibulovými hlízkami. Stonek je převážně bezlistý (výjimečně se jedná o lodyhu). Listy tvoří přizemní růžici, jejich tvar je úzký, čárkovitý. Květy jsou oboupohlavné. Vyskytující se většinou jednotlivě, mohou být uspořádané i do hroznovitých nebo vrcholičnatých květenství. Plod tvoří tobolka nebo bobule.^{67,68,69}

Tyto trvalky se vyskytují běžně v přírodě nebo jsou pěstovány jako okrasné rostliny.⁶⁹ Důležitou roli hrají i v léčitelství. V Jižní Africe se rostliny této čeledi tradičně používají k léčbě duševních poruch. Efektivita v této indikaci souvisí s obsahem alkaloidů, kterých bylo popsáno přes 500. Izolované alkaloidy nebo jejich extrakty prokázaly *in vitro* aktivitu v léčbě poruch CNS, úzkosti a deprese. K terapii AD se využívá inhibitor AChE galanthamin. Dle provedené studie alkaloid sanguinin vykazuje *in vitro* 10x vyšší účinnost než galanthamin.⁷⁰ Cytotoxické účinky byly popsány u lykorinu.⁶⁹

3.2.2.2 Rod *Narcissus* L.

Do tohoto rodu patří zhruba 50 až 70 druhů, které jsou rozšířeny v Evropě, Severní Africe i Blízkém východu.⁷¹ Jelikož se tyto druhy v přírodě velmi snadno samovolně kříží, je známo dalších zhruba 60 hybridů.⁶⁹ Narcisy najdeme na loukách, horách s vyšší nadmořskou výškou, v lesích, skalních útvarech i v bažinách.⁷²

Jedná se o vytrvalé byliny s podzemní kulovitou až vejčitou cibulí o velikosti 6 mm až 10 cm. Listy jsou přizemní, úzké, čárkovité, mohou připomínat listy travin. Stvol dutý, přímý a hranatý na svém konci nese květ nebo soubor květů uspořádaných v květenství. Květ tvoří 3 okvětní lístky ve dvou kruzích u báze srostlé v okvětní trubku. Uvnitř se nachází pakorunka. Další částí květu je 6 různě dlouhých tyčinek a spodní semeník. Květy narcisů se mohou pyšnit rozličnými barvami od bílé, žluté, oranžové až po růžovou či červenou. Mohou být jednobarevné nebo s různě zbarvenou pakorunkou a okvětními lístky. Plod tvoří trojboká tobolka.^{67,72}

Pro lepší orientaci se narcisy dělí do 12 skupin podle tvaru a počtu květů. Rozlišujeme narcisy trubkovité, dlouhokorunné, krátkokorunné, plnokvěté, Tazzeta, Poeticus, plané druhy, orchidejovité, motýlovité a smíšené. Dále potom Triandrus-hybridy, Cyclamineus-hybridy a Lonquilla-hybridy.⁷²

3.2.2.3 *Narcissus pseudonarcissus* L.

Narcis žlutý je považován za původce trubkovitých narcisů. Vyskytuje se na Pyrenejském poloostrově, v západní Evropě i ve Velké Británii.⁷³ Jedná se o 15 cm — 50 cm vysokou bylinu, která vykvétá na jaře. Vyskytuje se převážně na slunných místech s písčitohlinitou půdou bohatou na živiny a vláhu. Našli bychom ho tedy spíše na okrajích lesů, březích rybníků a loukách. Oblíbený je také v parcích a zahradách jako okrasná rostlina vhodná k osazování záhonů.⁶⁷ Odrůdy tohoto narcisu mají květy většinou jednotlivé, žluté nebo bílé. Pakorunka bývá sytě žlutě zbarvená, okraj má zubatý nebo laločnatý a přesahuje okvětní lístky. Do této skupiny patří také *Narcissus* 'Dutch Master' s charakteristickými žlutými květy.^{67,74}

Obrázek 1 *Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master'¹⁷⁵



3.2.3 Lidové léčení

Narcisy patří mezi rostliny hojně využívané v lidovém léčení. Silné protirakovinné účinky *Narcissus poeticus* L. byly známy již ve 4. století př. n. l. Hippokratovi z Kósu. Extrakt z *Narcissus pseudonarcissus* L. a *Narcissus poeticus* L. byl doporučován k léčbě kožních nádorů. Protirakovinné účinky *Narcissus tazetta* L. jsou dokumentovány i v bibli. V čínské a arabské medicíně byly hojně využívány olejové emulze z narcisu k léčbě rakoviny. Tyto poznatky byly uplatňovány i ve Střední Americe a Severní Africe.⁷⁶

3.2.4 Obsahové látky čeledi Amaryllidaceae a rodu *Narcissus* L.

Pro zástupce této čeledi je typický obsah alkaloidů. Tyto sloučeniny se nachází v celé rostlině, ale v nejvyšší koncentraci jsou kumulovány v podzemních orgánech. Můžeme je rozdělit na 7 hlavních strukturních typů, které jsou pojmenovány podle svého zástupce: lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazetin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthanin) a krinanový (krinin). K základním strukturním typům bychom mohli také přiřadit belladinový (*O*-methylbelladin), ze kterého vychází

vlastní biosyntetická dráha amarylkovitých alkaloidů. Vznik montaninového strukturního typu (montamin) nebyl zatím zcela objasněn.⁷⁷

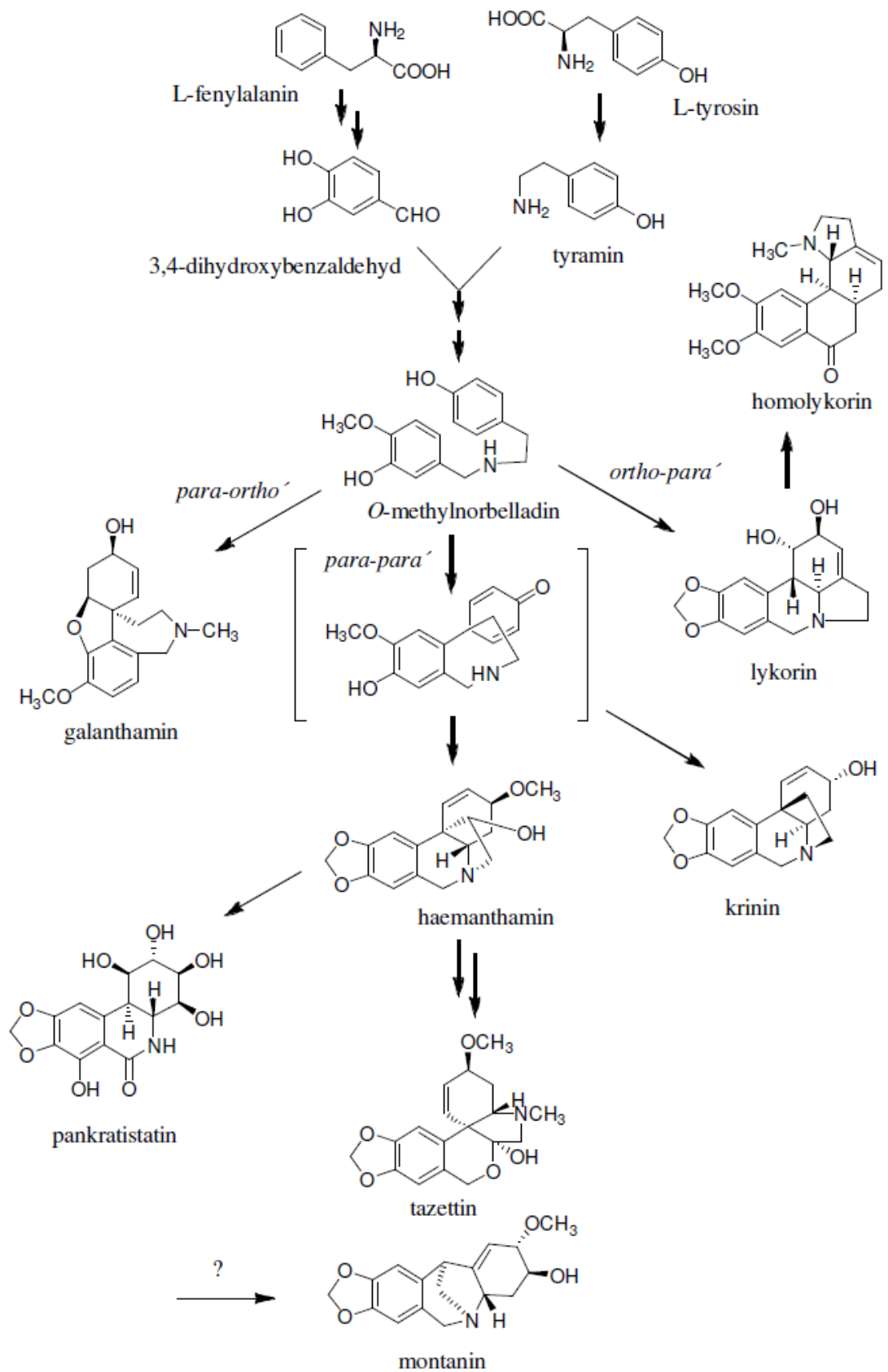
Biologická aktivita alkaloidů zastoupených v čeledi Amaryllidaceae je velmi široká. Prokázány byly AChE inhibiční účinky, dále protinádorové, antimalarické, antivirové, antimykotické, antibakteriální, protizánětlivé, analgetické a cytotoxické.^{78,77}

U zástupců rodu *Narcissus* L. jsou kromě alkaloidů obsaženy také další sekundární metabolity. Jedná se o karotenoidy, flavonoidy a betalainy, které jsou obsaženy v květech a jsou zodpovědné za jejich zbarvení. Flavonoidy mají navíc další prospěšné vlastnosti. Patří mezi ně antioxidační, protizánětlivé a protirakovinné účinky.⁷⁹

3.2.5 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy čeledi amarylkovitých vznikají specifickou biosyntetickou cestou, která se nazývá norbelladinová cesta.⁷⁷ Výchozí strukturu tvoří 2 AK L-fenylalanin a L-tyrosin. Tyto AK jsou svou chemickou strukturou velmi příbuzné, přesto je nelze v rostlinách zaměnit. Z tyrosinu vzniká tyramin a L-fenylalanin je přeměněn na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Přes několik mezistupňů z těchto sloučenin vzniká klíčový meziprodukt *O*-methylnorbelladin. Podle polohy oxidativního spojení aromatických kruhů *O*-methylnorbelladinu vzniká výše zmíněných 7 základních struktur alkaloidů. Pokud dojde ke spojení kruhů v poloze ortho-para vzniká lykorinový typ, od kterého je následně odvozen typ homolykorinový. Galanthaminový strukturní typ pochází přímo z *O*-methylnorbelladinu spojením kruhů para-ortho. Syntéza krinanového a haemanthaminového strukturního typu probíhá přes meziprodukt vytvořený oxidativním spojením kruhů *O*-methylnorbelladinu v polohách para-para. Poslední dva zmíněné strukturní typy pankratistatinový a tazzetinový jsou odvozeny od haemantaminového typu.^{78,80}

Obrázek 2 Biosyntéza hlavních strukturálních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae⁷⁷

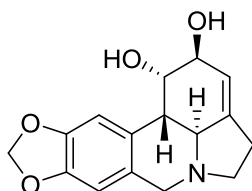


3.2.6 Lykorinový strukturní typ

Alkaloidy patřící do této skupiny, jsou deriváty pyrolo[de]fenanthridinu. Prvním izolovaným alkaloidem čeledi Amarylkovitých byl lykorin z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* L.⁸¹ Lykorin je současně i jeden z nejvíce se vyskytujících alkaloidů v této čeledi. Jedná se o silného inhibitora biosyntézy kyseliny askorbové, která potlačuje růst a proliferaci buněk včetně nádorových.⁸² Lykorin působí též protivirově (např. poliovirus), antimykoticky (*Saccharomyces cerevisiae*) a antimalaricky (*Trypanosoma brucei*).⁷⁷ Nedávné studie tohoto alkaloidu prokázaly další jeho potenciální účinky — antinociceptivní, protizánětlivé, hepatoprotektivní a hypotenzní.⁷⁸ Z hlediska terapie je velmi důležitá jeho protinádorová aktivita. Působí cytotoxicky na rakovinové buňky a následně dokáže indukovat apoptózu. Tyto účinky by mohly být využity v terapii leukémie.⁸³

Mezi další alkaloidy této skupiny patří např. karantin, pseudolykorin, 1-*O*-acetylykorin, anhydrolykorin, amarbellisin, galanthin a další. Všechny jmenované sloučeniny vykazují protinádorovou aktivitu. Jako nejúčinnější se prokázal amarbellisin a pseudolykorin.⁷⁷ Druhý jmenovaný navíc působí také proti některým RNA a DNA virům.⁸² Karantin a galanthin jsou připisovány analgetické účinky.⁸⁴

Obrázek 3 Lykorin



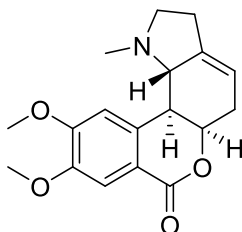
3.2.7 Homolykorinový strukturní typ

Základní skelet alkaloidů tohoto strukturního typu tvoří 2-benzopyrano[3,4]indol. Kromě hlavního zástupce homolykorinu patří do této skupiny např. 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin, hippeastrin, masonin, odulin, dobiusin, poetinatin a další.⁸¹

Homolykorin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin působí cytotoxicky na lidské jaterní HepG-2 a leukemické MOLT-4 nádorové buňky. Bohužel jejich účinek není zcela selektivní a zasahují i nenádorové buňky myších fibroblastů

LMTK. Hippeastrin působí také proti DNA-viru *Herpes simplex* a antimykoticky zejména vůči *Candida albicans*.⁷⁷

Obrázek 4 Homolykorin

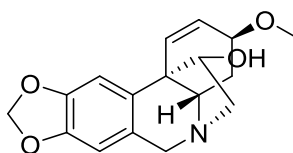


3.2.8 Haemantaminový a krinanový strukturní typ

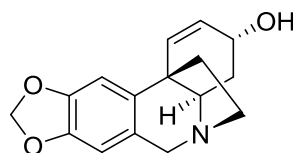
Jedná se o alkaloidy strukturně odvozené od 5,10b-ethanofenthridinu. Do této skupiny se řadí haemantamin, haemantidin, krinamin, vittatin, maritidin, papyramin, narcidin, bujein a další.⁸¹

Výrazné antiproliferativní účinky vůči nádorovým buňkám vykazuje haemantamin a jeho hydroxy derivát haemantidin. K jejich účinku jsou citlivé buňky A2780 vaječníků, SW1573 plic, T-47D prsu a WiDr střev.⁸⁵ Haemantamin působí navíc cytotoxicky vůči jaternímu karcinomu, výrazně antiparaziticky vůči *Plasmodium falciparum*, analgeticky a protizánětlivě.^{77,86,84} Mezi účinky haemantidinu můžeme zařadit taktéž antiparazitické, protizánětlivé a analgetické účinky.⁷⁷ Krinamin působí cytotoxicky vůči nádorovým buňkám a antibakteriálně vůči *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Dále může zapříčinit útlum dechu nebo snížení krevního tlaku.⁸⁴

Obrázek 5 Haemanthamin



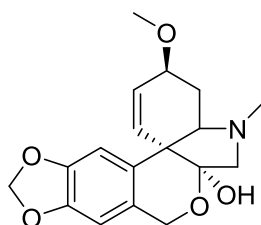
Obrázek 6 Krinin



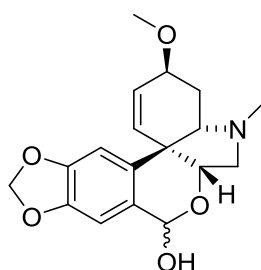
3.2.9 Tazettinový strukturní typ

Tazettin a jeho biologicky účinnější prekurzor pretazettin jsou odvozené od 2-benzopyrano[3,4-c]indolu.^{81,77} Tazettin vykazuje jen velmi mírný antimalarický účinek vůči *Plasmodium falciparum*.⁸⁶ Taktéž protinádorový efekt vůči leukemickým buňkám a cytotoxická aktivita proti fibroblastickým LMTK buňkám je slabá. Naopak pretazettin je řazen mezi nejúčinnější alkaloidy proti T-lymfoidním MOLT-4 buňkám. Tato látka působí na buňky Lewisova karcinomu, spontánní AKR lymfocytární leukémie a Rauscher leukémie. Jeho spektrum účinku je ale mnohem širší. Inhibicí RNA-dependentní DNA polymerasy působí také proti viru *Herpes simplex*. Dokáže zvýšit aktivitu doxorubicinu, potlačit funkci P-glykoproteinu a růst nádorových HeLa buněk.⁷⁷

Obrázek 7 Tazettin



Obrázek 8 Pretazettin



3.2.10 Pankratistatinový strukturní typ

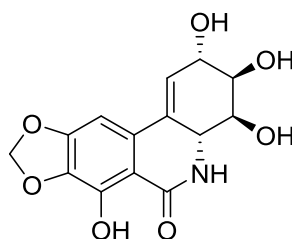
Základní skelet pankratistatinového strukturního typu, který reprezentují dva hlavní zástupci pankratistatin a narciklasin, tvoří fenanthridin.⁷⁷

Narciklasin prokázal účinnost proti tropickým RNA virům, hlavně flavivirům a bunyavirům, kteří způsobují horečnaté, hemoragické nebo encefalické onemocnění v různých koutech světa.⁸⁷ Potlačuje také růst buněk inhibicí syntézy bílkovin. Konkrétně se váže na ribozomální podjednotku 60S. Citlivé jsou rakovinové buňky sarkomu 180 a HeLa buňky.⁸⁸ Významná je schopnost indukovat apoptózu u buněk

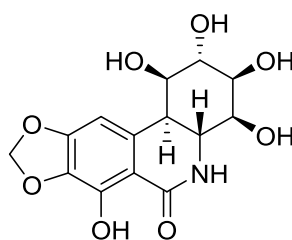
lidského karcinomu prostaty PC-3 a adenokarcinomu prsu MCF-7.⁷⁷ Mezi další významné účinky patří baktericidní vůči *Corinebacterium fascians* a antifungální proti *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*.^{77,87} V nedávné studii *in vitro* bylo zjištěno, že narciklasin snižuje produkci β A potlačením tvorby APP. Tyto poznatky byly ověřeny na modelu s využitím myši. Navíc byl prokázán pozitivní vliv narciklasinu na kognitivní funkce.⁸⁸

Druhý jmenovaný alkaloid pankratistatin vykazuje kromě antiparazitické aktivity výraznou cytotoxicitu. Dokáže inhibovat růst HeLa buněk a indukovat apoptózu buněk promyelocytární leukemie HL-60. Provedené studie navíc dokázaly zvýšenou selektivitu k nádorovým buňkám. Potenciální využití nachází v terapii žluté zimnice, horečky dengue a japonské encefalitidy, neboť působí proti flavivirům. Taktéž bunyaviry, které způsobují horečku údolí Rift, jsou k pankratistatinu citlivé.⁸⁷

Obrázek 9 Narciklasin



Obrázek 10 Pankratistatin



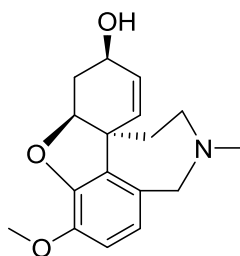
3.2.11 Galanthaminový strukturní typ

Základ tohoto strukturního typu tvoří dibenzofuran.⁸¹ Nejvýznamnějším zástupcem je galanthamin. Vzhledem k jeho chemické struktuře dokáže snadno přejít přes hematoencefalickou bariéru a vyvolat centrální účinky. Lze ho použít k terapii nervových chorob jako je demence, mánie, schizofrenie, paralýza nebo neurologické poranění.⁸⁴ Galanthamin vykazuje pouze slabé antimalarické účinky proti *Plasmodium*

falciparum, dokáže vyvolat bradykardii, silnou analgezii a zvrátit respirační útlum vyvolaný opioidy.^{86,84} V případě otravy organickými sloučeninami fosforu, jako jsou pesticidy a bojové chemické látky např. Soman, lze použít galanthamin jako účinné antidotum.⁸² Mezi jeho výhody patří široký terapeutický index, bezpečnost, dobrá snášenlivost, různé cesty podání a jen mírná toxicita.⁸⁹

Další zástupci galanthaminového strukturního typu jsou norgalanthamin, epigalanthamin, epinorgalanthamin, narcisin, narwedín a sanguinin.^{81,78} Mezi účinky narwedínu patří hypotenze, snížení srdeční frekvence a zrychlení dechu. Navíc dokáže zesílit analgetické působení morfinu a potencovat farmakologické účinky kofeinu.⁸⁴

Obrázek 11 Galanthamin



3.2.12 Aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae v inhibici AChE

Testy prokázaly, že pouze galanthaminový a lykorinový strukturní typ vykazují aktivitu v inhibici AChE. Jako pozitivní kontrola byl použit galanthamin. Nejvíce účinným alkaloidem byl určen sanguinin. Srovnatelnou aktivitu s galanthaminem projevoval 11-hydroxygalanthamin.⁹⁰

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Materiál a vybavení pro izolaci*

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- aceton p. a. (Penta a. s.) ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$)
- amoniak čistý, vodný roztok 25 — 27 % (Penta a.s.) (NH_3)
- cyklohexan p. a. (Penta a. s.) (C_6H_{12})
- destilovaná voda (H_2O)
- diethylamin p. a. (LachNer) (Et_2NH)
- ethanol 95 %, denaturovaný methanolem, p. a. (Penta a.s.) (EtOH)
- chloroform p. a. (Penta a.s.) (CHCl_3)
- toluen p. a. (Penta a. s.) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)

4.1.2 Pomocné látky

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

4.1.3 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo

Zásobní roztok Dragendorffova činidla se připraví smísením roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 (v/v).

Detekční roztok se připraví smísením 5 ml zásobního roztoku s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml vody.

roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody.

4.1.4 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S₁: toluen + diethylamin (9:1)

S₂: cyklohexan + aceton + amoniak (20:70:2)

4.1.5 Adsorbenty pro chromatografii

Komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ)

Nalévané desky se silikagelem: Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ)

Silikagel (velikost zrn 0,063 — 0,2 mm FLUKA) desaktivovaný 10 % vody

4.1.6 Přístrojové vybavení

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

Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)

Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany)

4.1.7 Rostinný materiál

Čerstvé cibule *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, fa Lukon Glads, Sadská, Česká republika. Verifikace provedena Prof. RNDr. L. Opletalem, CSc. Dokladové vzorky rostliny jsou uloženy v herbáři na FaF UK HK.

4.2 Obecné metody

4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna komerčně užívaná rozpouštědla byla před použitím přečištěna podle běžných laboratorních zvyklostí. Následně byla přečištěná rozpouštědla uchovávána v tmavých lahvích chráněných před světlem.

4.2.2 Odpařování rozpouštědel z extraktů a jejich skladování

Alkaloidní extrakty získané během sloupcové nebo preparativní chromatografie byly odpařeny na vakuové rotační odparce Büchi Rotavapor R-114 na vodní lázni

při 40 °C za sníženého tlaku. K odpaření alkaloidních roztoků menšího množství v ampulkách bylo použito vodní lázně zahřáté na teplotu 60 °C a proudu vzduchu. Získané frakce a čisté látky byly dosušeny pomocí vakuového exsikátoru nad silikagelem minimálně 24 hodin. Následně byly skladovány v chladničce při teplotě 2 — 8 °C.

4.2.3 Detekce alkaloidů

4.2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie

Přítomnost alkaloidů nebo jejich čistota byla zjišťována pomocí vzestupné tenkovrstvé chromatografie (TLC). Desky byly vyvíjeny v komorách nasycených mobilní fází. Sycení komor se odvíjelo dle velikosti komor 15 — 30 min. Vzorky byly na start chromatogramu nanášeny pomocí kapiláry v čáře. Po vyvinutí byl chromatogram sušen proudem vzduchu. K detekci bylo použito ultrafialové (UV) záření o vlnové délce 254 a 366 nm. Chromatogram pod UV lampou zeleně fluoreskoval a přítomnost alkaloidů se projevila jako tmavé skvrny, které fluorescenci zhašely. Následný postřík detekčním Dragendorffovým činidlem způsobil zviditelnění alkaloidů. Pozitivní reakce se projevila oranžovým zbarvením.

4.2.4 Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven naléváním suspenze silikagelu v mobilní fázi. Na povrch adsorbentu byla nanášena chromatografovaná směs v podobě roztěru. Roztěr byl připraven rozpuštěním vzorku v malém množství rozpouštědla, přidáním adsorbentu a odpařením rozpouštědla na vodní lázni.

4.2.5 Příprava preparativních litých TLC desek

K přípravě desek pro preparativní TLC byly použity skleněné desky o velikosti 15x15 cm se zdrsňeným povrchem. Na jejich povrch byla rovnoměrně nalita suspenze obsahující 6,5 g silikagelu GF 254 a přibližně 20 ml destilované vody. Nalítí suspenze předcházelo očištění desky CHCl_3 . Nalité desky se poté nechaly schnout nejméně 24 hodin.

4.3 Izolace alkaloidů z frakce ND 3 – 5 (18 g)

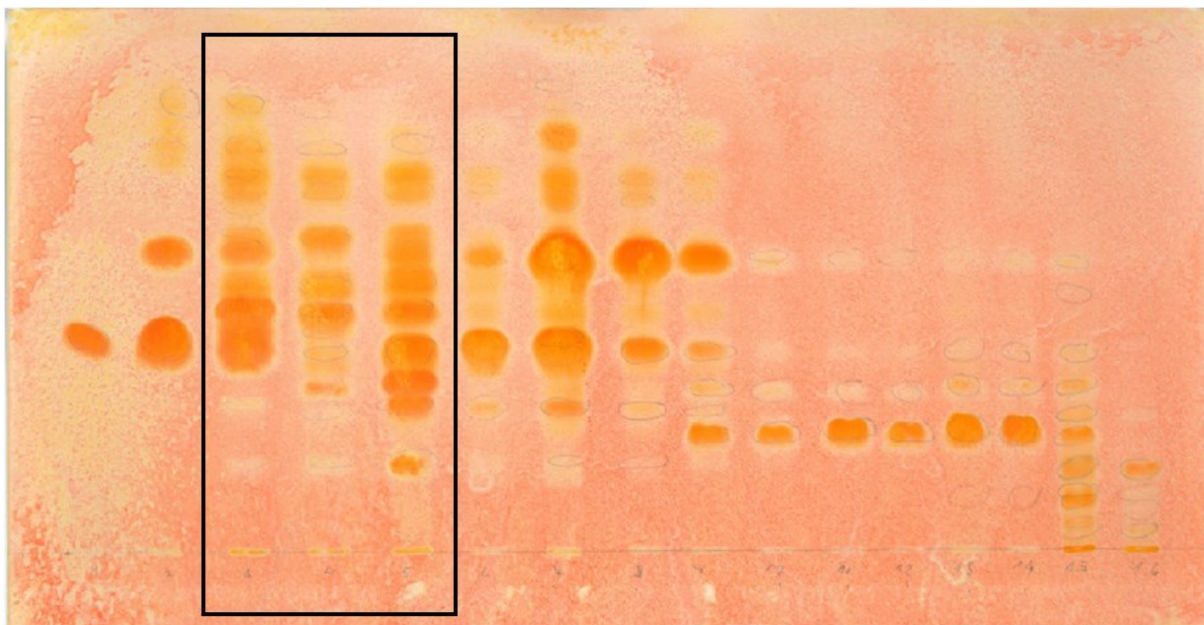
Cílem mé diplomové práce byla izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě ze spojené frakce ND 3 – 5, která byla získána ze sloupcové chromatografie alkaloidního sumárního výtřepku, kterou provedla v rámci doktorského studia Mgr. Daniela Hulcová. Separaci jednotlivých podfrakcí alkaloidního výtřepku popisuje z kvantitativního a kvalitativního hlediska tabulka 1, resp. obrázek 12. Detailní postup přípravy a separace je uveden v diplomové práci Zdeňky Dvořákové.

Kvalitativní složení jednotlivých frakcí bylo kontrolováno pomocí TLC. Frakce, které obsahovaly stejné alkaloidy, byly spojeny a vzniklo 12 frakcí.

Tabulka 1 Frakce získané ze sumárního alkaloidního extraktu⁹¹

Spojené frakce	Název frakce	Mobilní fáze	Hmotnost frakcí (g)
46-51	ND 1	Benzín + chloroform (60:40)	0,40
52-57	ND 2	Benzín + chloroform (50:50)	1,11
58-82	ND 3	Benzín + chloroform (50:50)	9,38
83-94	ND 4	Benzín + chloroform (50:50)	2,49
95-138	ND 5	Benzín + chloroform (45:55)	7,85
139-165	ND 6	Benzín + chloroform (45:55)	3,21
166-194	ND 7	Benzín + chloroform (45:55)	4,83
195-206	ND 8	Benzín + chloroform (60:40) Benzín + chloroform (65:35)	1,11
207-298	ND 9	Benzín + chloroform (75:25), (80:20), (85:15), (90:10), chloroform (100)	14,93
290-292	ND 10	Chloroform + ethanol (1:1)	7,24
293-301	ND 12	Chloroform + ethanol (1:1)	1,68
celková hmotnost extraktu			54,23

Obrázek 12 Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku



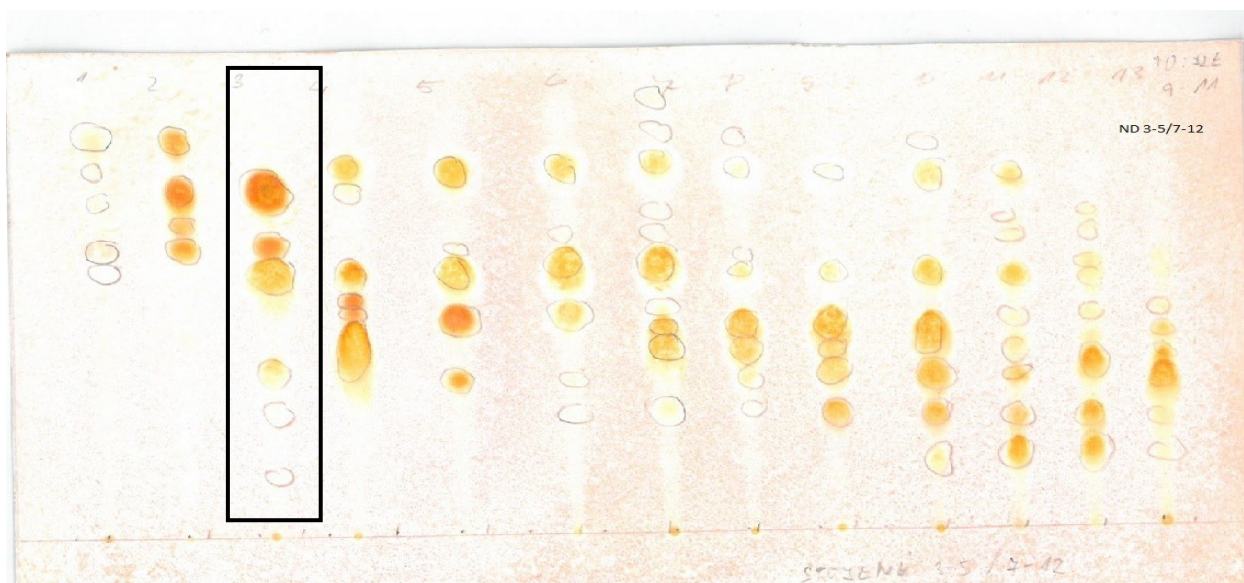
Adsorbent SiO₂ F 254, MF S₁, počet vyvíjení 1x, dráha 8,5 cm, detekce UV 254 a následně postřík Dragendorffovým činidlem

Dle kontrolního TLC byly frakce ND 3 až ND 5 velice podobné, a proto byly spojeny (cca 18 g) a byla provedena další sloupcová chromatografie.

Tabulka 2 Parametry sloupcové chromatografie spojené frakce ND 3 – 5

Adsorbent	1 420 g desaktivovaného silikagelu
Výška kolony	100 cm
Průměr kolony	5,8 cm
Mrtvý objem	2,18 l
Extrakt	18 g
Mobilní fáze	směs chloroformu a ethanolu v poměrech (99:1, 49:1, 97:3, 12:1, 1:1)
Výsledek	14 frakcí po 500 ml

Obrázek 13 Souhrnný chromatogram separace frakce ND 3 — 5



Adsorbent: Komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silica gel 60 F254 (Merck, CZ), MF — $C_6H_5CH_3$ + Et_2NH (9:11), počet vyvíjení 1x, detekce UV 254 a následně postřík Dragendorffovým činidlem

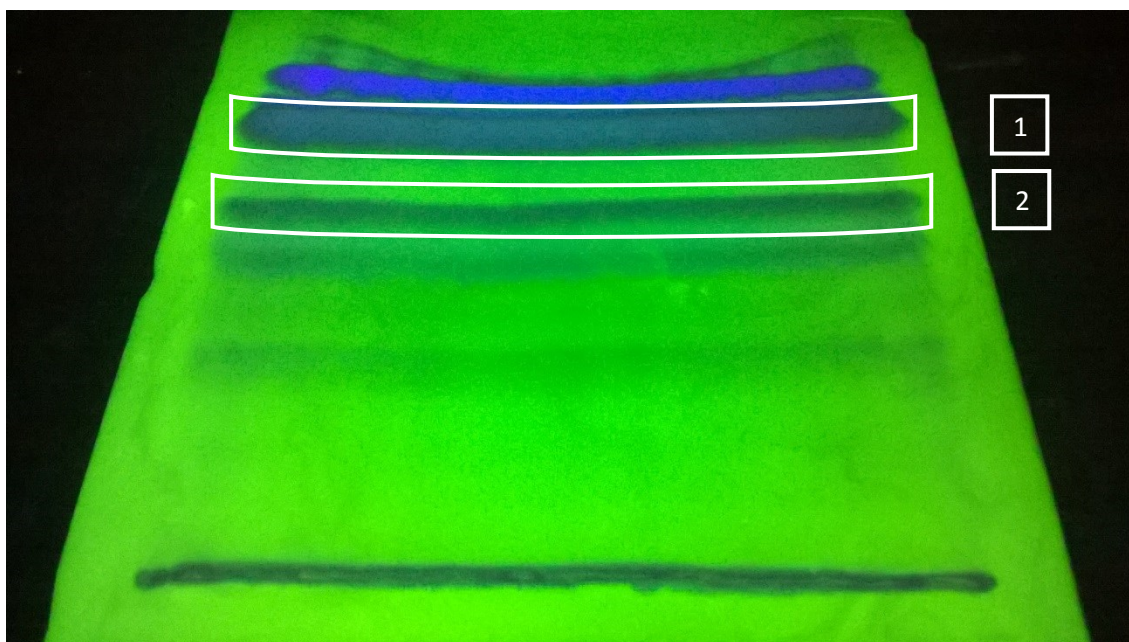
4.3.1 Separace alkaloidů z frakce ND 3 — 5/3 pomocí preparativní TLC (638 mg)

V rámci této diplomové práce byla zpracována frakce ND 3 — 5/3. Hmotnost frakce činila 638 mg. Vzorek byl rozpuštěn v $CHCl_3$ a nanesen v pruhu na skleněné preparativní desky. Desky byly vyvinuty v MF S_1 2x. Nanáška na jednu desku činila zhruba 35 mg.

Tabulka 3 Podmínky preparativní TLC

Frakce 3 — 5/3	638 mg
Adsorbent	Kieselgel 60 GF254 (Merck, CZ)
Chromatografické desky	15x15 cm, nanáška v pruhu
Počet desek	18
Chromatografická soustava	$C_6H_5CH_3$ + Et_2NH (9:1)
Vyvíjení	2x
Detekce	UV 254 nm

Obrázek 14 Chromatogram na skleněné lité TLC destičce



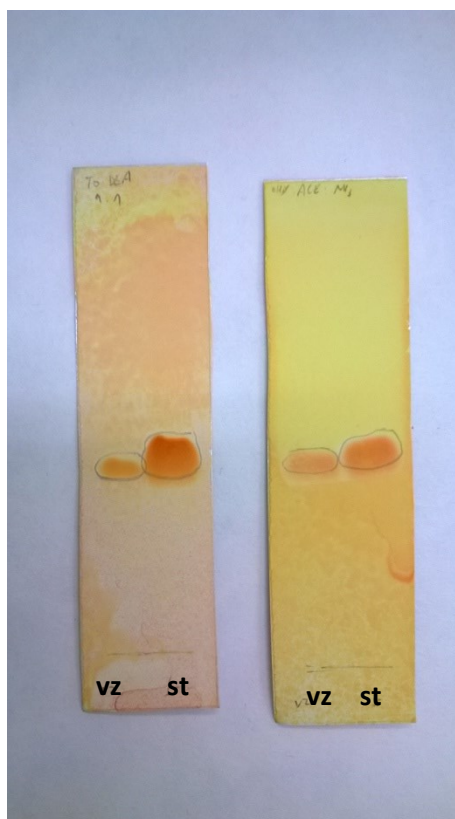
Adsorbent Kieselgel 60 GF254 (Merck, CZ), komora nasycená MF S₁, počet vyvíjení 2x, detekce UV 254

Po vyvinutí a vysušení chromatografických desek byl adsorbent s jednotlivými zónami separován, smíchán s křemelinou Celite 535 (1:1) a eluován směsí CHCl₃ + EtOH (1:1). Jednotlivé eluáty byly odpařeny.

Zóna číslo 1 (69,1 mg) byla zpracována jako první. Po odpaření eluátu se v baňce začaly tvořit krystalky, které byly rekrystalizovány z roztoku CHCl₃ + EtOH (1:1). Bylo získáno 22,4 mg bílé krystalické látky (NDM-1). Následně byl vzorek identifikován pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR) jako masonin.

Vzorek zpracovávaný v rámci 2. zóny byl předběžně pomocí GC-MS identifikován jako homolykorin. Pro ověření byla provedena srovnávací TLC vůči standardu. K ověření byly použity 2 různé vyvíjecí směsi S₁ a S₂. Skvrna vzorku vykazovala shodný R_f jako skvrna standardu.

Obrázek 15 Srovnávací chromatogram



Adsorbent komerční desky se silikagelem Merck: TLC Silica gel 60 F254 (Merck, CZ), komora nasycená (zleva) MF S₁ a S₂, počet vyvíjení 1x, detekce UV 254 a Dragendorffovo činidlo

30,2 mg vzorku ze zóny číslo 2 bylo dále přečištěno na dvou komerčních hliníkových deskách SiO₂ 60 F254 (20x10 cm, dráha 8,5 cm). Vzorek byl rozpuštěn v CHCl₃ a nanesen v pruhu. Jako vyvíjecí soustava byla zvolena soustava S₁. Vyvíjeno bylo 2x. Na základě UV detekce byly vypreparovány 2 zóny. Přečištění probíhalo stejným způsobem, jak bylo popsáno výše. Bylo získáno 20 mg bílé krystalické látky (NDM-2).

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů

4.4.1 Inhibice AChE a BuChE

4.4.1.1 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (ATChI) (použit 10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich) (BuTChI) (použit 10mM roztok)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98 % (Sigma-Aldrich) (DNTB) (použit 5mM roztok)
- dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- galanthamin hydrobromid 95 % (Changsha Organic Herb Inc., China)
- huperzin A 95 % (TAZHONGHUI — Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.4.1.2 Pufry

- 5mM fosfátový pufr pH 7,4
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
- 100mM fosfátový pufr pH 7,4

4.4.1.3 Materiál

- zdroj AChE — hemolyzát lidských erytrocytů
- zdroj BuChE — lidská plazma

4.4.1.4 Přístroje

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

4.4.1.5 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- teplota 37 °C

- prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- spektrofotometrické měření barevných produktů — vlnová délka 436 nm pro BuChE a 412 nm pro AChE
- 96 jamkové mikrotitrační destičky

4.4.1.6 Získávání erythrocytární AChE a BuChE z plazmy

Erythrocyty byly získány z čerstvě odebrané lidské krve, ke které byl přidán citrát sodný jako protisrážlivé činidlo (18 ml krve + 2 ml 3,4 % roztoku citrátu). Postupovalo se podle mírně upravené metody Stecka a Kanta. Ihned po odběru byla krev centrifugována za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611 rychlostí 4000 ot./min., při teplotě 4 °C, po dobu 10 min. Po centrifugaci byla plazma odebrána a uchovávána při 4 °C pro stanovení lidské BuChE (nejdéle 6hod). Erythrocyty byly převedeny do 50 ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrem o pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného metodou centrifugace (12 000 ot./min. Avanti J-301, rotor JA-30.50). K promýtým erythrocytům byl poté přidán na 10 min. 5mM fosfátový pufr o pH 7,4 v takovém množství, aby výsledný poměr erythrocyty : pufr činil 1:9. Po 10 min. došlo ke spontánní lýze erythrocytů. Následně byla okamžitě změřena aktivita vzniklého hemolyzátu — AChE a hemolyzát byl uchováván až do doby dalšího použití při teplotě — 22°C.

4.4.1.7 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím DTNB. Jako substráty slouží estery thiocholinu, které jsou štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu cholinesterasami.

Při měření aktivity látek se postupovalo následným způsobem. Nejprve bylo napipetováno 8,3 µl plazmy nebo lyzátu erythrocytů do jamek v mikrotitračních destičkách. Poté bylo přidáno 283 µl DTNB a 8,3 µl roztoku látek v DMSO o klesající koncentraci (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4 mM případně i nižší). Jako slepý roztok byl použit DMSO (8,3 µl). Po promíchání byla směs inkubována v přístroji reader Bio Tek 2 při 37 °C po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno do každé jamky 33,3 µl roztoku substrátu (5mM ATChI nebo 5mM BuTChI) a po 2 minutách byla změřena absorbance žlutého

produktu při příslušné vlnové délce (AChE — hemolýzát: 436 nm; BuChE — plazma: 412 nm). Barevný produkt vznikl navázáním SH-skupiny z thiocholinu na DTNB. Inhibice v % byla vypočítána podle vzorce:

$$I = 100 - (\Delta ABL/\Delta ASA) \times 100,$$

kde ΔABL je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔASA je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Hodnota IC_{50} byla vypočítána z naměřených hodnot nelineární regrese v programu GraphPad Prism. Výsledky byly porovnány s referenčními látkami galanthaminem, huperzinem A a rivastigminem.

4.4.2 Stanovení prolyloligopeptidasové inhibiční aktivity

4.4.2.1 Chemikálie

- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich)
- prolyloligopeptidasa (Sigma-Aldrich) (POP)
- bajkalin (Sigma-Aldrich)
- Z-Pro-prolinal (Sigma-Aldrich)
- dimethylsulfoxid p.a. (Sigma-Aldrich) (DMSO)
- 1,4-dioxan (Lachema)

4.4.2.2 Pufry

- 0,01M fosfátový pufr, pH 7,4 (složení: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl)

4.4.2.3 Přístroje

- ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

4.4.2.4 Podmínky měření

Experimenty se provádí při 37 °C a výsledný barevný produkt se stanovuje při 405 nm.

4.4.2.5 Stanovení

POP byla rozpuštěna v 0,01M fosfátovém pufru, její specifická aktivita činila 0,2 U/ml. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním v DMSO (10mM). Jednotlivá ředění byla získána zředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou. Kontrolní vzorek obsahoval stejnou koncentraci DMSO. Substrátem POP byl Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 50% 1,4-dioxanu (5mM). Zkušební roztoky byly připraveny smísením 170 μ l pufru, 5 μ l testované látky a 5 μ l roztoku POP. Po dobu 5 minut při 37 °C byla směs inkubována a poté bylo přidáno 20 μ l substrátu a směs v mikrotitračních destičkách byla inkubována po dobu dalších 30 minut při 37 °C. Vzniklý barevný produkt *p*-nitroanilin byl spektrofotometricky proměřen při vlnové délce 405 nm.

Účinnost testovaných látek byla vyjádřena jako hodnota IC₅₀. Získané hodnoty IC₅₀ byly zpracovány v programu GraphPad Prism a porovnány s referenčními látkami bajkalinem a Z-Pro-prolinalinem. Pomocí Microsoft Excel byly získány směrodatné odchylky.

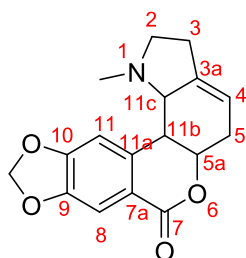
5. VÝSLEDKY

5.1 Identifikace izolovaných látek

Na základě výsledků z MS a NMR analýzy a porovnáním dat s literaturou, byly izolované látky identifikované jako homolykorin a masonin.

5.1.1 Určení struktury (+)-masonin (NDM-1)

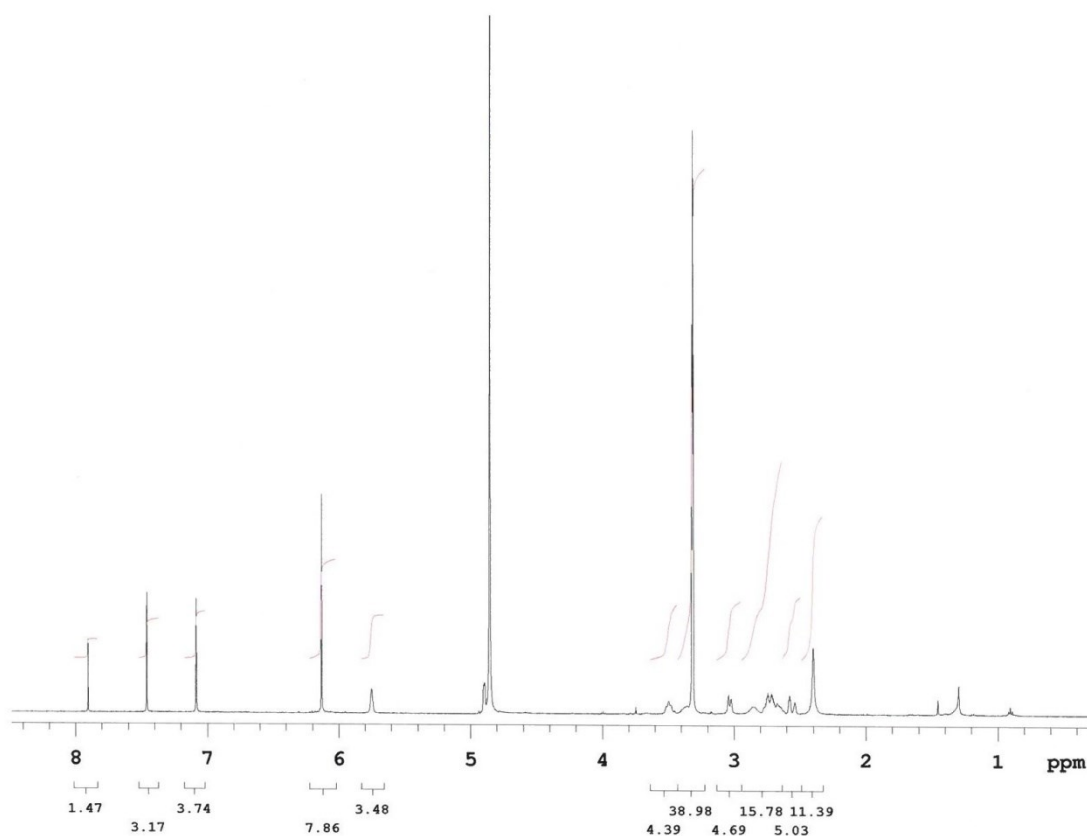
Obrázek 16 (+)-masonin



5.1.1.1 NMR analýza

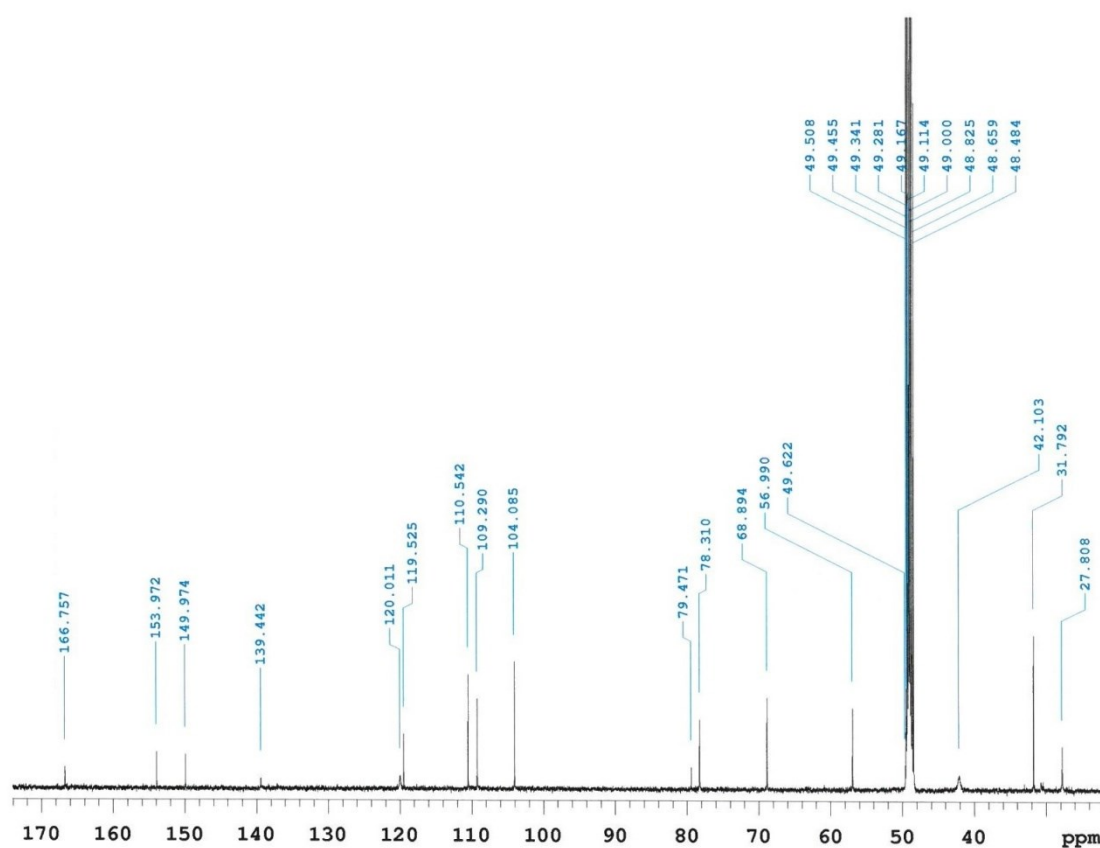
$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ 7.89 (1H, s, OH), 7.44 (1H, s, H8), 7.07 (1H, s, H11), 6.12 (2H, s, OCH_2O), 5.78-5.73 (1H, m, H4), 4.90-4.87 (1H, m, H5a), 3.52-3.44 (2H, m, H2, H11c), 3.04 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H11b), 2.93-2.80 (1H, m, H2), 2.77-2.67 (3H, m, H3, H5), 2.59-2.51 (1H, m, H5), 2.38 (3H, s, NCH_3).

Obrázek 17 ^1H NMR spektrum (+)-masoninu



^{13}C NMR (125MHz, CD_3OD) δ 166.8 (C7), 154.0 (C10), 150.0 (C9), 139.5 (C11a), 137.2 (C3a), 120.0 (C4), 119.5 (C7a), 110.5 (C8), 109.3 (C11), 104.1 (OCH_2O), 78.3 (C5a), 68.9 (C11c), 57.0 (C2), 42.1 (NCH_3), 42.0 (C11b), 31.8 (C5), 27.8 (C3).

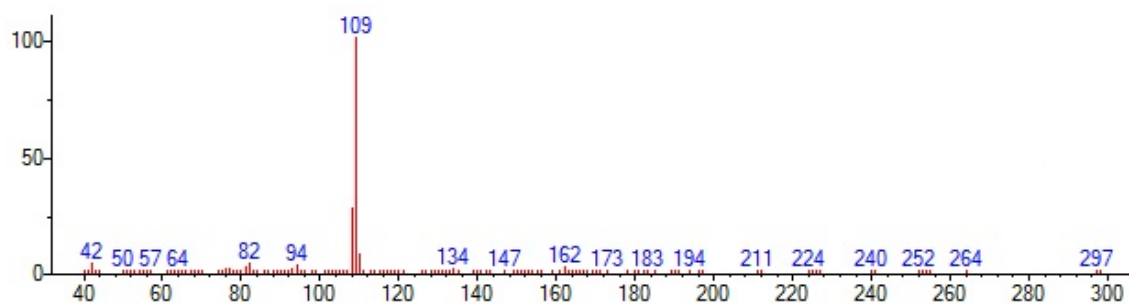
Obrázek 18 ^{13}C NMR spektrum (+)-masoninu



5.1.1.2 MS analýza

EI-MS (m/z) 299(<1), 109(100), 108(22), 110(77), 82(3), 42(3), 94(3)

Obrázek 19 EI-MS spektrum (+)-masoninu

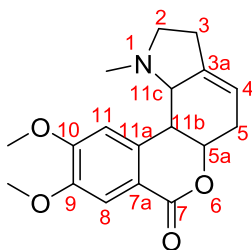


5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +196^\circ$, (c 0,09; CHCl_3).

5.1.2 Určení struktury (+)-homolykorin (NDM-2)

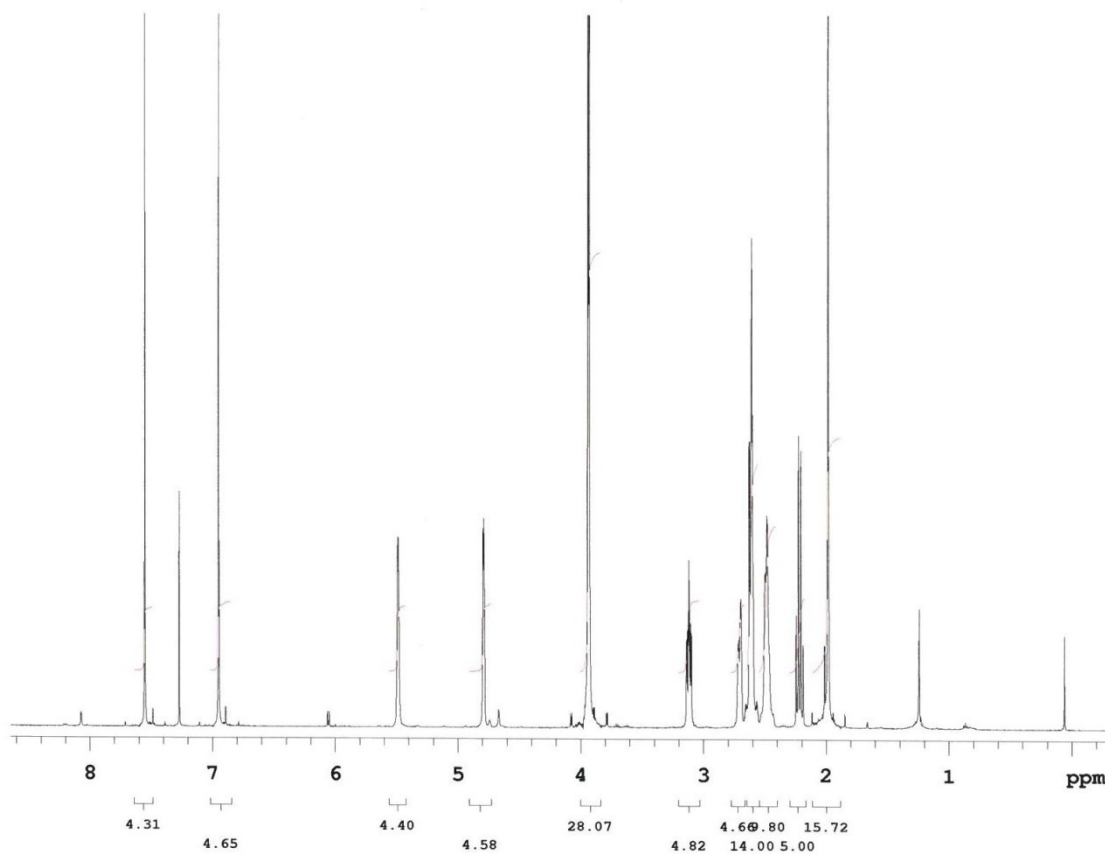
Obrázek 20 (+)-homolykorin



5.1.2.1 NMR analýza

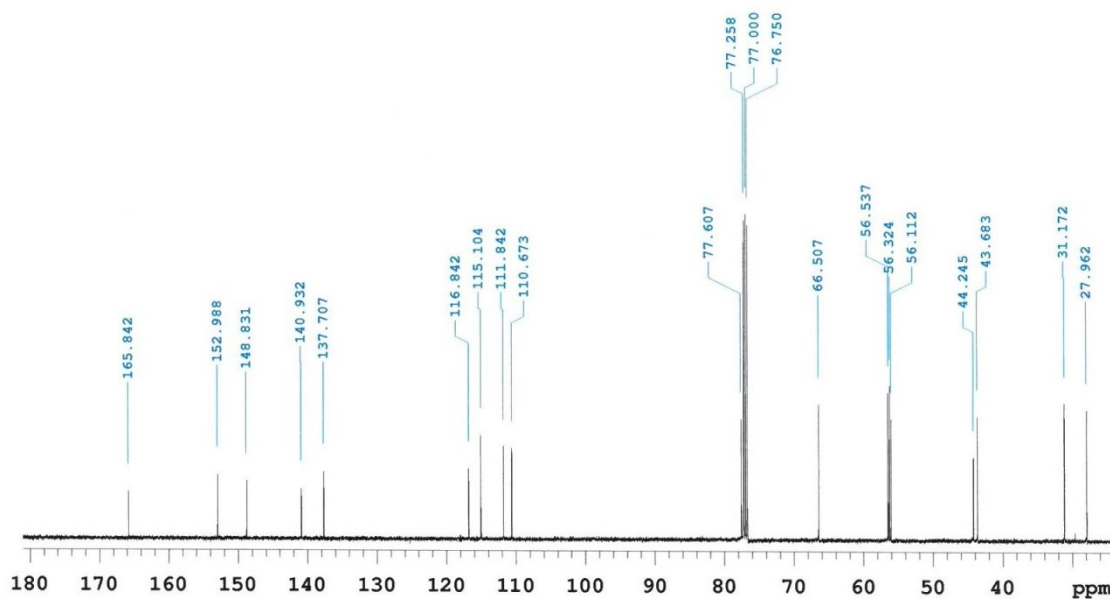
$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.54 (1H, s, H8), 6.94 (1H, s, H11), 5.50-5.45 (1H, m, H4), 4.79-4.76 (1H, m, H5a), 3.93 (3H, s, OCH_3), 3.92 (3H, s, OCH_3), 3.14-3.08 (1H, m, H2), 2.72-2.67 (1H, m, H11c), 2.63-2.61 (1H, m, H11b), 2.61-2.57 (1H, m, H5), 2.51-2.43 (2H, m, H3), 2.21 (1H, q, $J = 9.3$ Hz, H2), 1.97 (3H, s, NCH_3).

Obrázek 21 ^1H NMR spektrum (+)-homolykorinu



^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 165.8 (C7), 153.0 (C10), 148.8 (C9), 140.9 (C3a), 137.7 (C11a), 116.8 (C7a), 115.1 (C4), 111.8 (C8), 110.7 (C11), 77.6 (C5a), 66.5 (C11c), 56.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 56.1 (C2), 44.2 (C11b), 43.7 (NCH_3), 31.2 (C5), 28.0 (C3).

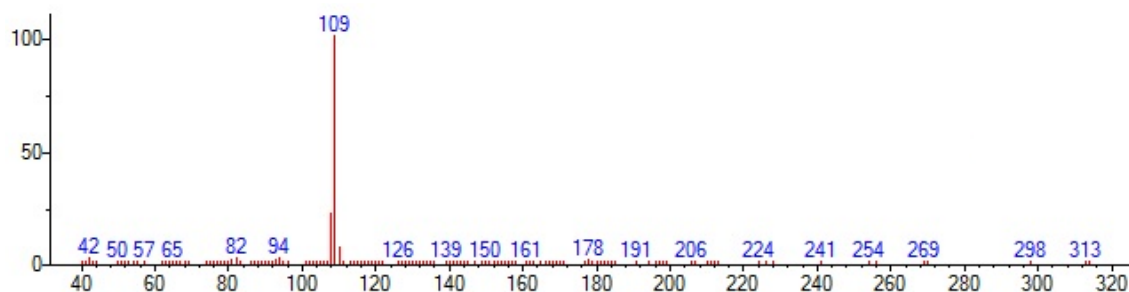
Obrázek 22 ^{13}C NMR spektrum (+)-homolykorinu



5.1.2.2 MS analýza

Obrázek 23 EI-MS spektrum (+)-homolykorinu

EI-MS (m/z) 315(<1), 109(100), 108(27), 110(8), 42(4), 82(4), 94(3)



5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +104^\circ$, (c 0,09, CHCl_3).

5.2 Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP

Tabulka 4 Výsledky inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů

Označení	Látka	AChE (IC_{50} , μM)	BuChE (IC_{50} , μM)	POP (IC_{50} , μM)
NDM-1	masonin	305 ± 34	229 ± 24	314 ± 34
NDM-2	homolykorin	$63,7 \pm 4,3$	151 ± 20	173 ± 41
Standardy pro AChE, BuChE	galanthamin	$1,710 \pm 0,1$	$42,3 \pm 1,3$	-
	huperzin A	0,033	>1000	-
	rivastigmin	0,037	0,003	-
Standardy pro POP	bajkalin	-	-	194 ± 14
	Z-Pro-prolinal	-	-	3,27 (nM)

6. DISKUSE

Náplní mé diplomové práce byla izolace obsahových látek z frakce ND 3 — 5, získané ze sumárního alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master'. Tato rostlina byla vybrána jako zdroj sekundárních metabolitů rostlin pro další studium biologické aktivity na základě výsledků inhibiční aktivity vůči BuChE ($IC_{50 \text{ BuChE}} = 25,5 \pm 2,3 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Za použití sloupcové chromatografie a následné preparativní TLC byly z dané frakce získány dvě látky, které byly dle výsledků MS, NMR analýzy a optické otáčivosti identifikovány jako (+)-masonin a (+)-homolykorin. Izolované látky byly dále testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE, BuChE a POP. Naměřené hodnoty byly porovnávány se standardy galanthaminem ($IC_{50 \text{ AChE}} = 1,710 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 42,3 \pm 1,3 \text{ } \mu\text{M}$), huperzinem A ($IC_{50 \text{ AChE}} = 0,033 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} > 1000 \text{ } \mu\text{M}$), rivastigminem ($IC_{50 \text{ AChE}} = 0,037 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 0,003 \text{ } \mu\text{M}$) a Z-Pro-prolinalinem ($IC_{50 \text{ POP}} = 3,27 \text{ nM}$).

Homolykorin byl dříve nalezen v mnoha zástupcích rodu *Narcissus* L. — *Narcissus bujei* Fdez. Casas, *N. Confusus* Pugsley, *N. cyclamineus* DC. cv. February Gold, *N. eugeniae* Fdez. Casas, *N. incomparabilis* Mill. cv. Helios, *N. jonquilla* L. cv. Golden Sceptre, *N. muñozzi-Garmendiae* Fdez. Casas, *N. odorus* L. var. rugulosus, *N. pallidiflorus* Pugsley, *N. panizzianus* Parl., *N. papyraceus* Ker. Gawl., *N. poeticus* L., *N. poeticus* L. var. *ornatus* Hort., *N. poeticus* L. cv. Daphne, *N. primigenius* Fdez. Casas a Laínz, *N. pseudonarcissus* L., *N. radinganorum* Fdez. Casas, *N. tazzeta* L., *N. tortifolius* Fdez. Casas, *N. triandrus* L. cv Thalia, *N. vasconicus*. Dle dostupné literatury nebyl homolykorin dosud izolován z *Narcissus pseudonarcissus* var. 'Dutch Master'.⁸¹ Podle získaných hodnot byl (+)-homolykorin určen jako mírný inhibitor BuChE a POP a středně silný inhibitor AChE ($IC_{50 \text{ AChE}} = 63,7 \pm 4,3 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 151 \pm 20 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ POP}} = 173 \pm 41 \text{ } \mu\text{M}$). Homolykorin byl již na cholinesterasovou inhibiční aktivitu v minulosti testován, přičemž bylo dosaženo shodných výsledků.⁹² Na inhibici POP nebyl (+)-homolykorinu dosud testován.

Přítomnost masoninu byla prokázána v *Narcissus bujei* Fdez. Casas, *N. jonquilla* L. cv. Golden Sceptre a *N. pseudonarcissus* L. Taktéž ještě nebyl izolován z *Narcissus pseudonarcissus* var. 'Dutch Master'.⁸¹ (+)-masonin byl na aktivitu vůči těmto enzymům testován vůbec poprvé ($IC_{50 \text{ AChE}} = 305 \pm 34 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ BuChE}} = 229 \pm 24 \text{ } \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ POP}} = 314 \pm 34 \text{ } \mu\text{M}$) a vykazoval pouze mírnou aktivitu vůči AChE, BuChE a POP. Zjištěné hodnoty

korelují s literaturou, která udává, že alkaloidy homolykorinového strukturního typu, do kterého řadíme oba izolované alkaloidy, nevykazují výraznou cholinesterasovou aktivitu.⁹⁰ Významná inhibice AChE je spojena se zástupci galanthaminového a lykorinového strukturního typu s výjimkou samotného lykorinu.⁹³ Naměřené hodnoty můžeme porovnat s dalším zástupcem homolykorinového strukturního typu hippeastrinem, který má obdobnou strukturu jako masonin. Liší se pouze navázanou OH skupinou na C₅.⁹⁴

Zatím není dostupná literatura, která by popisovala inhibiční aktivitu POP alkaloidů homolykorinového typu. Mírná inhibiční aktivita Amaryllidaceae alkaloidů vůči POP byla nalezena u alkaloidů beladinového (3'-*O*-demethylbelladin $IC_{50} = 369 \pm 33 \mu M$), krininového (bufanidrin $IC_{50} = 366 \pm 39 \mu M$) a lykorinového (1-*O*-acetyllykorin $IC_{50} = 448 \pm 50 \mu M$) strukturního typu.⁹⁵

7. ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce byly z vybrané spojené frakce ND 3 — 5, získané z chromatografické separace sumárního alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master', izolovány 2 látky. Následně byly identifikovány pomocí NMR, MS analýzy a optické otáčivosti. Získané údaje byly porovnány s odbornou literaturou a alkaloidy byly určeny jako (+)-masonin a (+)-homolykorin. Obě látky byly testovány na vybrané enzymy AChE, BuChE a POP. Výsledná inhibiční aktivita alkaloidů byla mírná až střední a tyto sloučeniny se z hlediska inhibice výše uvedených enzymů nejeví jako perspektivní pro potenciální využití v terapii AD.

8. ABSTRAKT

Rýdlová Kateřina: Alkaloidy *Narcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae) a jejich biologická aktivita III. Diplomová práce 2017. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.

Cílem této práce byla izolace obsahových látek z přidělené frakce ND 3 — 5, která byla připravena sloupcovou chromatografií alkaloidního extraktu z *Narcissus* 'Dutch Master'. Příprava alkaloidního extraktu a sloupcová chromatografie byla provedena Mgr. Danielou Hulcovou v rámci její doktorské práce. Pomocí sloupcové a preparativní TLC chromatografie byly z frakce ND 3 — 5 získány 2 látky v čistém stavu NDM-1 a NDM-2. Pomocí NMR, GC-MS analýzy, optické otáčivosti a porovnáním získaných údajů s literaturou byly tyto struktury určeny jako (+)-masonin a (+)-homolykorin.

Izolované alkaloidy byly následně testovány na inhibiční aktivitu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase, plazmatické butyrylcholinesterase a prolyloligopeptidase. Aktivita alkaloidů byla vyjádřena jako IC_{50} : (+)-masonin ($IC_{50\text{ AChE}} = 305 \pm 34 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 229 \pm 24 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 314 \pm 34 \mu\text{M}$), (+)-homolykorin ($IC_{50\text{ AChE}} = 63,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 151 \pm 20 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 173 \pm 41 \mu\text{M}$). V porovnání se standardy galanthaminem ($IC_{50\text{ AChE}} = 1,710 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 42,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$), huperzinem A ($IC_{50\text{ AChE}} = 0,033 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$) a rivastigminem ($IC_{50\text{ AChE}} = 0,037 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 0,003 \mu\text{M}$) vykazoval (+)-masonin mírnou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám, zatímco (+)-homolykorin se jevil jako středně silný inhibitor AChE. Oba alkaloidy vykazovaly mírnou inhibici POP v porovnání se standardem Z-Pro-prolinalinem ($IC_{50\text{ POP}} = 3,27 \text{ nM}$).

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

9. ABSTRACT

Rýdlová Kateřina: Alkaloids *Narcissus* 'Dutch Master' (Amaryllidaceae) and their biological activity III. Diploma thesis 2017. Charles university in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology.

The aim of this work was isolation of compounds from the selected fraction ND 3 — 5 obtained by column chromatography of a *Narcissus* 'Dutch Master' alkaloid extract. Preparation of the extract and its column chromatography was performed by Mgr. Daniela Hulcová as a part of her doctoral study. Two substances NDM-1 and NDM-2 were isolated from fraction ND 3 — 5 by column chromatography and preparative TLC. The structures were determined as (+)-masonine and (+)-homolycorine on the basis of NMR, GC-MS analysis, optical rotation and their comparison with literature data.

Isolated alkaloids were tested on inhibitory activity against human erythrocyte acetylcholinesterase, plasma butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase. Activity of alkaloids was expressed as IC_{50} values: (+)-masonine ($IC_{50\text{ AChE}} = 305 \pm 34 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 229 \pm 24 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 314 \pm 34 \mu\text{M}$), (+)-homolycorine ($IC_{50\text{ AChE}} = 63.7 \pm 4.3 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 151 \pm 20 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ POP}} = 173 \pm 41 \mu\text{M}$). In comparison with standards of galanthamine ($IC_{50\text{ AChE}} = 1.710 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 42.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$), huperzine A ($IC_{50\text{ AChE}} = 0.033 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$) and rivastigmine ($IC_{50\text{ AChE}} = 0.037 \mu\text{M}$, $IC_{50\text{ BuChE}} = 0.003 \mu\text{M}$) showed (+)-masonine mild inhibitory activity against cholinesterase, meanwhile (+)-homolycorine appeared as a moderate AChE inhibitor. Both alkaloids showed mild POP inhibition in comparison with standard Z-Pro-prolinaline ($IC_{50\text{ POP}} = 3.27 \text{ nM}$).

Key words: *Narcissus* 'Dutch Master', Amaryllidaceae, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, homolycorine alkaloids, Alzheimer's disease

10. POUŽITÁ LITERATURA

-
- ¹ <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/civilizacni-nemoci-aneb-nemoci-zapadniho-zivotniho-stylu-447075>; staženo 7.2.2017.
- ² Čevela R., Čeledová L., Kalvach Z., Holčík J., Kubů P. Sociální gerontologie. Východiska ke zdravotní politice a podpoře zdraví ve stáří. Grada, Praha 2014.
- ³ Vališ M., Kalnická D. Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi* 2011; 12: 33-36.
- ⁴ Hartl J., Palát K. Farmaceutická chemie I. Karolinum, Praha 2004.
- ⁵ Holmerová I., Jarolímová E., Nováková H. Alzheimerova choroba v rodině. Pfizer, Praha 2004.
- ⁶ Koukolík F., Jirák R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Grada, Praha 1998.
- ⁷ Hamilton S.I. Psychologie stárnutí. 1. vyd. Portál, Praha 1999.
- ⁸ Jirák R., Obenberger J., Preiss M. Alzheimerova choroba. Maxdorf, Praha 1998.
- ⁹ Vágnerová M. Psychopatologie pro pomáhající profese: variabilita a patologie lidské psychiky. 1. vyd. Portál, Praha 1999.
- ¹⁰ Höschl C. Psychiatrie pro praktické lékaře. 1. vyd. H&H, Jinočany 1996.
- ¹¹ Duthey B. Background paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias. Priority Medicines for Europe and the World, 2013.
- ¹² Anders W., Jonsson L., Bondd J., Prince M., Winblad B. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 2013; 9: 1-11.
- ¹³ Prince M., Wimo A., Guerchet M., Ali G.C., Wu Y.T., Prina M. World Alzheimer report 2015 The global impact of Dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer s Disease International, London 2015.
- ¹⁴ Holmerová I., Jurášková B., Müllerová D., Vidovičová L., Habrcetlová L., Matoulek M., Suchá J., Šimůnková M. Průvodce vyšším věkem: manuál pro seniory a jejich pečovatele. 1. vyd. Mladá fronta, Praha 2014.
- ¹⁵ Holmerová I., Mátlová M. Dopisy České alzheimerovské společnosti. 2. rozš. vyd. Česká alzheimerovská společnost, Praha 2012.
- ¹⁶ Lužný J. Gerontopsychiatrie. 1. vyd. Triton, Praha 2012.
- ¹⁷ Glenner J. A., Stehman J. M., Davagnino J., Galante M. J., Green M. L. Péče o člověka s demencí. 1. vyd. Portál, Praha 2012.
- ¹⁸ Tsai MS., Tangalos EG., Petersen RC., Smith GE., Schaid DJ., Kokmen E., Ivnik RJ., Thibodeau SN. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *The American Journal of Human Genetics* 1994; 54: 643-9.
- ¹⁹ Cataldo JK., Prochaska JJ., Glantz SA. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's disease: An analysis controlling for tobacco industry affiliation. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010; 19: 465-80.
- ²⁰ Amstrong R. A.: What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica* 2013; 51: 169-88.

-
- ²¹ <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/priciny-alzheimerovy-choroby>; staženo 23.10.2016.
- ²² Callone P. R., Kudlacek C., Vasiloff B. C., Manternach J., Brumback R. A. Alzheimerova nemoc: 300 tipů a rad, jak ji zvládat lépe. 1. vyd. Grada, Praha 2008.
- ²³ Růžička E., Jiráček R. Alzheimerova nemoc a jiné demence. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, Praha 2001.
- ²⁴ Jiráček R. Poruchy chování a nálady u demencí. *Psychiatrie pro praxi* 2011; 12: 56-60.
- ²⁵ Jiráček R., Dušková J., Malá E., Neubauer K., Obenberger J. Demence. Maxdorf, Praha 1999.
- ²⁶ Růžička E., Holmerová I., Höschl C., Jiráček R., Líněk V., Pidman V., Raboch J., Rektorová I., Topinková E. Diferenciální diagnostika a léčba demencí: příručka pro praxi. 1. vyd. Galén, Praha 2003.
- ²⁷ Herle P., Brožová H., Jiráček R., Medová E., Novotná M., Roth J., Skála B., Šonka K., Špatenková V. Diferenciální diagnostika v neurologii. Raabe, Praha 2015.
- ²⁸ Jiráček R. Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR. *Neurologie pro praxi* 2011; 12: 135-37.
- ²⁹ Chu L. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Medicinal Journal* 2012; 18: 228-37.
- ³⁰ Čechová L., Bartoš A., Doležil D., Řípková D. Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi* 2011; 12: 175-80.
- ³¹ Hamilton I.S. Psychologie stárnutí. 1. vyd. Portál, Praha 1999.
- ³² Rössner P., Hort J., Rektorová I., Bartoš A., Rusina R., Líněk V., Sheardová K. Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurologie pro praxi* 2009; 10: 237-41.
- ³³ Koukolík F., Jiráček R. Diagnostika a léčení syndromu demence. 1. vyd. Grada, Praha 1999.
- ³⁴ Ferreira-Vieira T. H., Guimaraes I. M., Silva F. R., Ribeiro F. M. Alzheimer's Disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology* 2016; 14: 101-15.
- ³⁵ Ementa F., Tayebati SK. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Current Medicinal Chemistry* 2008; 15: 488-98.
- ³⁶ Hořejší J.: Symposium 1: Alzheimerova choroba. Galén, Praha 1999.
- ³⁷ Darvesh S., Hopkins DA., Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase: *Nature Review Neuroscience* 2003; 4: 131-8.
- ³⁸ Jiráček R., Holmerová I., Božrová C., Franková V., Kalvach Z., Konrád J., Vaňková H., Jarolímová E. Demence a jiné poruchy paměti. Komunikace a každodenní péče. Grada, Praha 2009.
- ³⁹ Swerdlow R.H. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging* 2007; 2: 347-59.
- ⁴⁰ Mohamed T., Shakeri A., Rao PP. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 113: 258-72.

-
- ⁴¹ Evin G., Hince C. BACE1 as a therapeutic target in Alzheimer's disease: rationale and current status. *Drugs Aging* 2013; 30: 755-64.
- ⁴² O'Brien RJ., Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience* 2011; 34: 185-204.
- ⁴³ Mandelkow E.-M., Mandelkow E. Biochemistry a cell biology of tau protein in neurobrillary degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2: a006247.
- ⁴⁴ Jin N., Yin X., Yu D., Cao M., Gong C.-X., Iqbal K., Ding F., Gu X., Liu F. Truncation and activation of GSK - 3 β by calpain I: a molecular mechanism links to tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 2015; 5: 8187.
- ⁴⁵ Liu CC., Kanekiyo T., Xu H., Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Review Neurology* 2013; 9: 106-18.
- ⁴⁶ Huang Y., Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Disease* 2014; 72PA: 3-12.
- ⁴⁷ Kamat PK., Kalani A., Rai S., Swarnkar S., Tota S., Nath C., Tyagi N. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's diseases: Understanding the therapeutics strategies. *Molecular Neurobiology* 2016; 53: 648-61.
- ⁴⁸ Pimentel C., Nascimento L.B., Pousada C.R., Menezes R.A. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: Insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 2012: 132146.
- ⁴⁹ Silva DF., Selfridge JE., Lu J., E L., Cardoso SM., Swerdlow RH. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's diseases: possible targets for therapeutic intervention. *Advances in Pharmacology* 2012; 64: 83-126.
- ⁵⁰ Zhu X., Perry G., Smith MA., Wang X. Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's diseases. *Journal of Alzheimer's Diseases* 2013; 33: 253-62.
- ⁵¹ Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee HG., Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1842: 1240-7.
- ⁵² Franková V., Hort J., Holmerová I., Jiráček R., Vyhňálek M. Alzheimerova demence v praxi. Konsenzus psychiatricko-neurologicko-geriatrický. Mladá Fronta a.s., Praha 2011.
- ⁵³ <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Farmakoterapie-demenci-pokroky-v-lecbe-a-aktualni-doporuceni/6-L-1Ae.magarticle.aspx>; staženo 19.11.2016.
- ⁵⁴ Unzeta M., Esteban G., Bolea I., Fogel W.A., Ramsay R.R., Youdim M.B.H, Tipton K.F., Marco-Contelles J. Multi-target directed donepezil-like ligands for Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience* 2016; 10: 205.
- ⁵⁵ Brunovský M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoc. *Neurologie pro praxi* 2007; 2: 112-117.
- ⁵⁶ Zemek F., Drtinova L., Nepovimova E., Sepsova V., Korabecny J., Klimes J., Kuca K. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opinion on Drug Safety* 2014; 13: 759-74.
- ⁵⁷ Krejčová G., Ševelová L. Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitory acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* 2003; 72: 37-44.

-
- ⁵⁸ Lilienfeld S. Galantamin a novel cholinergic drug with unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Reviews* 2002; 8: 159-76.
- ⁵⁹ Gao J., Inagaki Y., Li X., Kokudo N., Tang W. Research progress on natural products from traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2013; 7: 46-57.
- ⁶⁰ Drtinová L., Pohanka M. Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chemické listy* 2013; 107: 12-15.
- ⁶¹ Konrath EL., Passos Cdos S., Klein LC Jr., Henriques AT. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 65: 1701-25.
- ⁶² Martin J., Kršková Z., Dušek J. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* 2011; 7: 39-41.
- ⁶³ Tampi R.R., Van Dyck C.H. Memantine: Efficacy and safety in mild-to severe Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2007; 3: 245-58.
- ⁶⁴ <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2014/6-2014/Extrakt-z-Ginkgo-biloba-EGb-761-v-lecbe-organickech-psychickeh-poruch/e-1AD-1MK-1N5.magarticle.aspx>; staženo 21.11.2016.
- ⁶⁵ Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., Chlebek J., Hošťálková A., Adamcová M., Šafratová M., Jun D., Opletal L., Ločárek M., Macáková K. Isoquinoline alkaloids as propyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* 2015; 103: 192-6.
- ⁶⁶ <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id42018/>; staženo 22.2.2017.
- ⁶⁷ Štěpánková J. a kolektiv. Květena České republiky. Academia, Praha 2010.
- ⁶⁸ <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>; staženo 3.1.2017.
- ⁶⁹ Jahodář L. Farmakobotanika: semenné rostliny. Karolinum, Praha 2006.
- ⁷⁰ Rønsted N., Symonds Matthew R. E., Birkholm T., Christensen S. B., Meerow A. W., Molander M., Mølgaard P., Petersen G., Rasmussen N., Van Staden J., Stafford G. I., Jäger A. K. Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of Amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology* 2012; 12: 182-193.
- ⁷¹ Bryan J. E. Kapesní atlas Cibuloviny. Knižní klub, Praha 2010.
- ⁷² Timmermann A. Zahradní rostliny: 500 nejkrásnějších druhů. Rebo, Čestlice 2005.
- ⁷³ Štursa J. Cibulové a hlíznaté rostliny. Aventinum, Praha 1997.
- ⁷⁴ Křesadlová L., Vilím S. Encyklopedie tulipánů, hyacintů, begonií a dalších cibulnatých a hlíznatých rostlin. Computer press, Brno 2009.
- ⁷⁵ <http://www.americanmeadows.com/flower-bulbs/daffodil-flower-bulbs/daffodil-bulbs-dutch-master>; staženo 3.1.2017.
- ⁷⁶ Evidente A., Kornienko A. Anticancer evaluation of structurally diverse. Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews* 2009; 8: 449-59.

-
- ⁷⁷ Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* 2013; 107: 701-708.
- ⁷⁸ Guo Y., Pigni NB., Zheng Y., de Andrade JP., Torras-Claveria L., Borges Wde S., Viladomat F., Codina C., Bastida J. Analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloid profiles in *Lycoris* species by GC-MS. *Natural Product Communication* 2014; 9: 1081-6.
- ⁷⁹ Li X., Lu M., Tang D., Shi Y. Composition of carotenoids and flavonoids in *Narcissus* cultivars and their relationship with flower color. *Public Library of Science One* 2015; 10: 1-14.
- ⁸⁰ Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* 2011: 65-100.
- ⁸¹ Hanks G. R. *Narcissus and daffodils: The genus Narcissus*. Taylor & Francis, London, New York 2002.
- ⁸² Takos A. M., Rook F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 11713-41.
- ⁸³ Zupkó I., Réthy B., Hohmann J., Molnár J., Ocsosvzki I., Falkay G. Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo* 2009; 23: 41-8.
- ⁸⁴ Refaat J., Kamel M.S., Ramadan M. A., Ali A. A. *Crinum*: an endless source of bioactive principles: A review. Part V. Biological profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2013; 4: 1239-52.
- ⁸⁵ Cedrón J. C., Ravelo A. G., Leon L. G., Padrón J. M., Estévez-Braun A. Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* 2015; 20: 13854-63.
- ⁸⁶ Sener B., Orhan I., Satayavivad J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 2003; 17: 1220-3.
- ⁸⁷ Kornienko A., Evidente A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* 2008; 108: 1982-2014.
- ⁸⁸ Fürst R. Narciclasine — an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. *Planta Medica* 2016; 82: 1389-94.
- ⁸⁹ Tsvetkova D., Obreshkova D., Zheleva-Dimitrova D., Saso L. Antioxidant activity of galanthamine and some of its derivatives. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 20: 4595-608.
- ⁹⁰ López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 2002; 71: 2521-9.
- ⁹¹ Dvořáková Z. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2016.
- ⁹² 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. *Natural Product Communications* 2013; 8: 781-5.

⁹³ Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natur Product Communications* 2013; 8: 1541-44.

⁹⁴ Pagliosa L. B., Monteiro S. C., Silva K. B., de Andrade J. P., Dutilh J., Bastida J., Cammarota M., Zuanazzi J. A. S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine* 2010; 17: 698-701.

⁹⁵ Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš J., Hulcová D., Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková Š., Opletal L., Nováková L., Jun D., Chlebek J., Cahlíková L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* 2016; 6: 80114-120.