

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii
civilizačních onemocnění

Alkaloids of the Amaryllidaceae family as potential drugs in therapy of diseases
of affluence

Doktorská disertační práce

Mgr. Kateřina Breiterová

Školitelka: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Konzultantka: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Studijní obor: Farmakognosie a toxikologie přírodních látek

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením své školitelky a konzultantky. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, duben 2019

Mgr. Kateřina Breiterová

PODĚKOVÁNÍ

Tato disertační práce vznikla za podpory Specifického vědeckého výzkumu Univerzity Karlovy, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové (SVV 260 412) a celofakultního výzkumného programu PROGRES, který je na Univerzitě Karlově řešen v rámci Programů rozvoje výzkumných oblastí.

Ráda bych zde poděkovala za spolupráci zejména pracovní skupině ADINACO, především mé školitelce doc. ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vedení v průběhu celého doktorského studia, mé konzultantce PharmDr. Anně Hošťákové, Ph.D. za rady a pomoc při řešení laboratorních obtíží a prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za jeho cenné odborné i životní rady a pomoc. Také bych ráda vyjádřila své díky i celé katedře farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a přátelský kolektiv.

Za spolupráci při měření biologických aktivit a fyzikálně-chemických vlastností alkaloidů bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jířímu Kunešovi, Ph.D. a mgr. Janě Maříkové za měření a interpretaci NMR spekter alkaloidů, doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za změření HRMS spekter nově izolované látky, doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. a mgr. Martině Hrabínové za stanovení inhibiční POP aktivity, PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za změření inhibiční aktivity vůči GSK-3 β , RNDr. Radimu Havelkovi Ph.D. a ing. Ivo Doskočilovi za měření cytotoxické aktivity. V neposlední řadě si mé díky zaslouží i Diana Fontinha, Ph.D. za mé vedení během stáže v IMM Lisboa.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK	9
1 ÚVOD	11
2 CÍL PRÁCE.....	13
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1 Čeled Amaryllidaceae.....	14
3.1.1 Taxonomická klasifikace.....	14
3.1.2 AmA a jejich biosyntéza	15
3.1.3 Rod <i>Narcissus</i> L.	15
3.1.3.1 Alkaloidy izolované z rodu <i>Narcissus</i> L.....	17
3.2 Civilizační onemocnění	19
3.2.1 Alzheimerova choroba	20
3.2.1.1 Teorie amyloidní kaskády	20
3.2.1.2 Hypotéza τ -proteinu	24
3.2.1.3 Cholinergní teorie	25
3.2.1.4 Glutamátergní systém a jeho vliv na rozvoj AD.....	26
3.2.1.5 Genetické příčiny	27
3.2.1.6 Ostatní příčiny vzniku AD	28
3.2.1.7 Léčiva v terapii AD.....	29
3.2.1.8 Adjuvantní terapie AD.....	31
3.2.2 Nádorová onemocnění.....	33
3.2.2.1 Přírodní látky v terapii nádorových onemocnění.....	34
3.2.2.2 Cytotoxická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů.....	36
3.3 Malárie.....	37
3.3.1 Průběh malarické infekce	39
3.3.2 Diagnostika.....	40
3.3.3 Problematika léčby a rozvoj rezistence	41
3.3.4 Antimalarická aktivita AmA	42
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení pro izolaci a identifikaci alkaloidů	45
4.1.1 Chemikálie	45
4.1.2 Adsorbenty pro chromatografii	46
4.1.3 Činidla pro detekci alkaloidů	47
4.1.4 Pomocný materiál.....	47

4.1.5	Přístroje	48
4.1.6	Databáze použité pro vyhodnocování výsledků	48
4.2	Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení pro stanovení biologické aktivity alkaloidů	48
4.2.1	Chemikálie	48
4.2.2	Buněčné linie	50
4.2.3	Pufry	50
4.2.4	Přístroje použité ke stanovení biologické aktivity alkaloidů	50
4.2.5	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i>	51
4.2.6	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP	51
4.3	Metody	52
4.3.1	Obecné postupy	52
4.3.2	Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů	54
4.4	Studium biologické aktivity izolovaných alkaloidů	56
4.4.1	Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterasám	56
4.4.2	Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidase	57
4.4.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β	58
4.4.4	Stanovení inhibiční aktivity proti jaternímu stadiu malárie <i>in vitro</i>	59
4.4.5	Stanovení cytotoxické aktivity <i>in vitro</i>	60
4.4.6	Stanovení inhibiční aktivity vůči AKR1C3	61
4.5	Rostlinný materiál	62
4.6	Izolace alkaloidů	62
4.6.1	Izolace látek ze spojených alkaloidních frakcí	65
5	VÝSLEDKY	68
5.1	GC-MS analýza sumárního alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí <i>Narcissus cv. Professor Einstein</i>	68
5.2	Alkaloidy izolované z <i>Narcissus cv. Professor Einstein</i> a jejich strukturní analýza	71
5.2.1	NPE-1: Masonin	71
5.2.2	NPE-2: Homolykorin	72
5.2.3	NPE-3: Ismin	73
5.2.4	NPE-4: Karanin	74
5.2.5	NPE-5: Galanthamin	75
5.2.6	NPE-6: Narwedín	76
5.2.7	NPE-7: Lykoraminon	77
5.2.8	NPE-8: Pluviin	78
5.2.9	NPE-9: Inkartin	79

5.2.10	NPE-10: Galanthin	80
5.2.11	NPE-11: Lykoramin	81
5.2.12	NPE-12: Epinorgalanthamin	82
5.2.13	NPE-13: Norlykoramin	83
5.2.14	NPE-14: Haemanthamin	84
5.2.15	NPE-15: Hippeastrin	85
5.2.16	NPE-16: Epimaritidin.....	86
5.2.17	NPE-17: 9- <i>O</i> -Methylpseudolykorin isomer	87
5.2.18	NPE-18: Lykorin	88
5.2.19	NPE-19: Tazettin.....	89
5.2.20	NPE-20: Eugenin.....	90
5.2.21	NPE-21: Norpluviin	91
5.2.22	NPE-22: 9- <i>O</i> -Demethylmaritidin	92
5.2.23	NPE-23: Pankracin	93
5.2.24	NPE-24: 9- <i>O</i> -Demethylhomolykorin	94
5.2.25	NPE-25: 7-Oxonorpluviin	95
5.3	Výsledky biologických testů a aktivit izolovaných alkaloidů	98
5.3.1	Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k enzymům spojených s Alzheimerovou chorobou	98
5.3.2	Výsledky stanovení antimalarického působení izolovaných alkaloidů.....	100
5.3.3	Výsledky stanovení cytotoxického působení izolovaných alkaloidů při koncentraci 10 μ M	103
5.3.4	Výsledky stanovení inhibiční aktivity vůči AKR1C3 při koncentraci 20 μ M.	106
6	DISKUSE	107
7	ABSTRAKT	112
8	ABSTRACT	114
9	PŘEHLED PUBLIKACÍ A STÁŽÍ	116
9.1	Původní práce	116
9.2	Konference.....	117
9.2.1	Přednášky	117
9.2.2	Flash postery	118
9.2.3	Postery	118
9.3	Stáž	118
9.4	Účelová finanční podpora.....	119
10	LITERATURA	120

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A2780	buněčná linie karcinomu vaječníku
A549	buněčná linie adenokarcinomu plic
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AKR1C3	aldoketoreduktasa 1C3
AMK	aminokyselina
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
A β	β -amyloid
AICD	cytosolová intracelulární APP doména
AMPA	(S)-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové receptory
BACE1	β -sekretasa
BuChE	butyrylcholinesterasa
Caco-2	buněčná linie kolorektálního karcinomu
CNS	centrální nervová soustava
CTF	C-terminální fragment APP
cv.	pěstovaná odrůda
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FAD	familiální forma Alzheimerovy choroby
FHS 74Int	buněčná linie zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva
GC	plynová chromatografie
gCOSY	gradient correlation spectroscopy (NMR metoda)
GSK-3 β	glykogen synthasa kinasa 3 β
HEB	hematoencefalická bariéra
<i>h</i> AChE	humánní acetylcholinesterasa
<i>h</i> BuChE	humánní butyrylcholinesterasa
HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního čípku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

HT-29	buněčná linie kolorektálního karcinomu
HuH-7	buněčná linie hepatomu
ChAT	cholinacetyltransferasa
IL	interleukin
Jurkat	buněčná linie akutní leukémie T lymfocytů
LRP	low-density lipoprotein receptory
MCF-7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MMPs	matrixové metaloproteasy
MOLT-4	buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie
MRC-5	buněčná linie zdravých plicních fibroblastů
MS	hmotnostní spektrometrie
MTCH	mitochondrie
NFTs	neurofibrilární klubka
NHDF	buněčná linie zdravých dermálních fibroblastů
NMDAR	<i>N</i> -methyl-D-aspartátové receptory
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy (NMR metoda)
NPE	<i>Narcissus</i> cv. Professor Einstein
PANC-1	buněčná linie epitelálního karcinomu slinivky
POP	prolyloligopeptidasa
PSEN	presenilin
RAGE	receptory pro glykované produkty
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAOS-2	buněčná linie osteosarkomu
sAPP	solubilní APP fragment
SI	index selektivity
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
VLC	vakuová kapalinová chromatografie

PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK

- Obr. 1 Norbelladinová biosyntetická cesta AmA.
- Obr. 2 Montanin.
- Obr. 3 *Narcissus* cv. Professor Einstein.
- Obr. 4 Schéma štěpení APP α - a β -sekretasou.
- Obr. 5 Schéma bludného kruhu tvorby a ukládání A β chronické zánětlivé reakce.
- Obr. 6 Schéma selhání clearance A β působením mikroglíí a chronického zánětu v mozku.
- Obr. 7 Schéma fyziologického a patofyziologického působení τ -proteinu.
- Obr. 8 Schéma metabolismu ACh.
- Obr. 9 Vliv přítomnosti isoformy ApoE4 v mozku.
- Obr. 10 Schéma návaznosti rizikových faktorů podílejících se na rozvoji AD.
- Obr. 11 Inhibitory cholinesteras využívané v terapii AD.
- Obr. 12 Inhibitor NMDAR – memantin.
- Obr. 13 Látky s potenciálním účinkem v adjuvantní terapii AD.
- Obr. 14 Distribuce nádorových onemocnění ve světě.
- Obr. 15 Struktura lykorinu, haemanthaminu, narciklasinu a pankratistatinu.
- Obr. 16 Komár rodu *Anopheles*.
- Obr. 17 Endemické oblasti ohrožené malárií.
- Obr. 18 Schéma životního cyklu *Plasmodium* sp.
- Obr. 19 Krevní roztěr pacienta s malárií.
- Obr. 20 Struktury vybraných antimalarik.
- Obr. 21 TLC spojených frakcí 1 – 15, S1.
- Obr. 22 TLC spojených frakcí 13 – 27, S5.
- Obr. 23 GC-MS analýza sumárního alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí *Narcissus* cv. Professor Einstein.
- Obr. 24 NMR analýza isomeru 9-O-methylpseudolykorinu.
- Obr. 25 NMR analýza 7-oxonorpluviinu.
- Obr. 26 HRMS analýza 7-oxonorpluviinu provedená za účelem stanovení přesné Mr.
- Obr. 27 Míra infekce a buněčné konfluence v procentech v porovnání s kontrolou.
- Obr. 28 Obecný vzorec derivátů ambellinu.

- Obr. 29 Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity některých derivátů ambellinu na koncentraci.
- Obr. 30 Míra infekce a buněčné konfluence v procentech v porovnání s kontrolou (DMSO).
- Obr. 31 A Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity na koncentraci B vzorec primachinu.
- Obr. 32 Screening inhibiční aktivity Amaryllidaceae alkaloidů vůči AKR1C3.
-
- Tab. 1 Vybraní zástupci Amaryllidaceae alkaloidů jednotlivých strukturních typů izolovaných z rodu *Narcissus* L.
- Tab. 2 AmA, jejich deriváty a aktivita vůči vybraným kmenům *P. falciparum*.
- Tab. 3 Haemanthamin, lykorenin, lykorin, jejich deriváty a jejich antimalarická aktivita.
- Tab. 4 Vytvájecí soustavy použité pro preparativní a analytickou TLC.
- Tab. 5 Průběh sloupcové chromatografie.
- Tab. 6 Parametry sloupcové chromatografie.
- Tab. 7 Mobilní fáze použité pro kontrolní TLC v průběhu sloupcové chromatografie.
- Tab. 8 Parametry vakuové sloupcové chromatografie frakce 25.
- Tab. 9 Průběh vakuové sloupcové chromatografie frakce 25.
- Tab. 10 Alkaloidy identifikované v sumárním alkaloidním extraktu *Narcissus* cv. Professor Einstein pomocí GC-MS a popis jejich hmotnostních spekter.
- Tab. 11 Přehled izolovaných látek.
- Tab. 12 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči *hAChE* a *hBuChE*.
- Tab. 13 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči POP a GSK-3 β .
- Tab. 14 Pět derivátů ambellinu s nejlepší inhibiční aktivitou vůči jaternímu stadiu *P. berghei*.
- Tab. 15 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči buňkám nádorových linií.
- Tab. 16 Hodnoty IC₅₀ vůči jednotlivým buněčným liniím.
- Tab. 17 Hodnoty IC₅₀ vůči dvěma buněčným liniím kolorektálního karcinomu.

1 ÚVOD

Rostliny a jejich obsahové látky obklopují člověka od nepaměti a jsou jím využívány, nejen jako úkryt, zdroj potravy a materiálu k výrobě oděvů a nástrojů, ale i pro své léčivé nebo popřípadě toxické působení. Lidé využívali rostlin nejprve zcela empiricky, posléze je začali používat cíleně k léčení konkrétních onemocnění nebo zmírnění jejich projevů. Například Hippokrates z Kósu používal přípravky na bázi olejového extraktu z rostlin rodu *Narcissus* L. k léčbě nádorů dělohy¹ již v 5. století před naším letopočtem. Již z doby kolem roku 1550 př. n. l., z doby starověkého Egypta, pochází Ebersův papyrus se záznamy o více než 800 léčivých rostlin a jejich použití. Můžeme v něm najít informace o použití česneku, jalovce, skočce, aloe, konopí a mnoha dalších rostlin, z nichž se řada dodnes využívá v léčbě nebo izolaci účinných látek².

Většina biologicky účinných látek přírodního původu patří mezi sekundární metabolity, které tvoří velmi širokou škálu různorodých struktur a stejně pestré je i spektrum účinků, které tyto látky mohou mít na lidský organismus. Jednou z velmi významných skupin sekundárních metabolitů jsou alkaloidy – organické látky, které ve své molekule obsahují alespoň jeden atom dusíku a odvozují se především od různých aminokyselin. Mezi významné čeledi obsahující alkaloidy patří např. čeledi Papaveraceae, Solanaceae, Berberidaceae, Rubiaceae a v neposlední řadě i čeleď Amaryllidaceae, která obsahuje charakteristickou skupinu sekundárních metabolitů zvaných Amaryllidaceae alkaloidy, jimiž se zabývá tato disertační práce.

Termín farmakognozie byl definován před více než 200 lety, avšak dodnes tento obor jako součást oboru farmacie neztratil nic ze své důležitosti, i když by se tak vzhledem k rychlému rozvoji syntetických léčiv mohlo zdát. Jak uvádí Newman a Cragg v práci z roku 2016³, 51 % všech léčiv registrovaných mezi léty 1981 a 2014 a 65 % všech léčiv charakteru malé molekuly je v určitém vztahu s látkou přírodního původu. Jedná se o látky izolované z rostlinného materiálu (galanthamin, paklitaxel) nebo syntetizované podle přírodní předlohy (vinkamin). Další možností jsou polosyntetické deriváty přírodních látek připravené za účelem lepší dostupnosti, vyšší účinnosti nebo menších nežádoucích účinků (docetaxel, vinpocetin). I řada látek zcela syntetického původu je inspirovaná přírodní strukturou nebo farmakoforem (pethidin, metadon). Důležitým faktem je, že prozatím bylo podrobně studováno pouze 5 % z celkového počtu přibližně 250 000 známých rostlinných taxonů⁴. Vzhledem k výše uvedeným číslům a také neustále se zvedajícímu zájmu všeobecné veřejnosti o fytofarmaka, role farmakognozie v kontextu farmacie rozhodně neklesá^{5,6}.

V rozvinutých zemích světa jsou civilizační (chronická) onemocnění stále větší hrozbou. Zatímco se rozvojové země potýkají s malárií, ebolou a jinými infekčními nemocemi, ve

vyvinutějších zemích lidé trpí převážně chronickými nepřenositelnými onemocněními, jako jsou onemocnění kardiovaskulárního systému, hypercholesterolemie, diabetes mellitus, mrtvice, chronická onemocnění dýchacího traktu, chronické selhání ledvin, ale i nádorová onemocnění. V poslední době roste význam neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova a Alzheimerova choroba), u nichž je nejvýznamnějším rizikovým faktorem věk. Podle dat WHO z roku 2018 zemře na některé z těchto onemocnění 41 milionů lidí ročně, což je přibližně 71 % všech úmrtí na světě^{7,8}. Toto alarmující číslo pouze podtrhuje důležitost výzkumu a vývoje nových účinných a bezpečných léčiv, mimo jiné odvozených od přírodních látek.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla izolace alkaloidů z čerstvých cibulí taxonu *Narcissus* cv. Professor Einstein z čeledi Amaryllidaceae za účelem jejich strukturní identifikace a testování jejich biologických aktivit.

Dílčí cíle:

- zpracování literární rešerše týkající se výskytu alkaloidů v rodu *Narcissus* L. a jejich biologické aktivity,
- izolace co největšího počtu alkaloidů z extraktu připraveného z čerstvých cibulí *Narcissus* cv. Professor Einstein,
- určení struktury izolovaných látek na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností (NMR, MS, X-ray, optická otáčivost),
- testování biologických aktivit jednotlivých izolovaných alkaloidů (inhibice lidských cholinesteras, prolyloligopeptidasy, glykogen synthasy kinasy-3 β a aldo-keto reduktasy; stanovení cytotoxické aktivity a dalších biologických aktivit),
- výběr látek perspektivních pro další a podrobnější biologické studie, případně pro přípravu polosyntetických derivátů za účelem rozšíření portfolia testovaných látek.
- analýza a vyhodnocení získaných výsledků, sepsání a obhájení disertační práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Čeled Amaryllidaceae

3.1.1 Taxonomická klasifikace⁹

Říše:	rostliny (Plantae)
Podříše:	cévnaté rostliny (Tracheophyta)
Oddělení:	krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída:	jednoděložné (Liliopsida)
Řád:	chřestotvaré (Asparagales)
Čeleď:	amarylkovité (Amaryllidaceae)

Čeleď Amaryllidaceae je prezentována víceletými jednoděložnými bylinami, které jsou rozděleny do 3 podčeledí (Agapanthoideae, Allioideae, Amaryllidoideae), 85 rodů a přibližně 1100 druhů rostlin¹⁰ a nespočet jejich vyšlechtěných kultivarů. Do této čeledi patří zejména cibuloviny (např. rody *Narcissus* L., *Galanthus* L., *Leucojum* L., *Zephyranthes* Herb., *Amaryllis* L. a mnoho dalších), ale můžeme v ní nalézt i rostliny s oddenky (např. *Clivia*). Většina rostlin této čeledi roste v tropech, subtropích a teplých oblastech jižní Evropy. V České republice můžeme nalézt pouze zástupce tří rodů – *Narcissus* L., *Galanthus* L. a *Leucojum* L. V současné době je známo okolo 27 000 alkaloidů a čeleď Amaryllidaceae s téměř 600 strukturně popsányými alkaloidy (Amaryllidaceae alkaloidy, AmA) se řadí mezi dvacet nejdůležitějších alkaloidních čeledí¹¹. AmA jsou skupinou alkaloidů charakteristickou pouze pro čeleď Amaryllidaceae a vykazují širokou různorodou škálu biologických účinků. Mohou inhibovat cholinesterasy, popř. mít cytotoxický, antimykotický, antivirotický, antibakteriální, antiprotozoální nebo analgetický účinek, kvůli nimž byly a jsou rostliny této čeledi používány v tradiční medicíně¹²⁻¹⁶. Příkladem může být již dříve uvedené využití olejového extraktu z *Narcissus poeticus* L. k léčbě nádorů dělohy Hippokratem z Kósu již ve čtvrtém století př. n. l.¹.

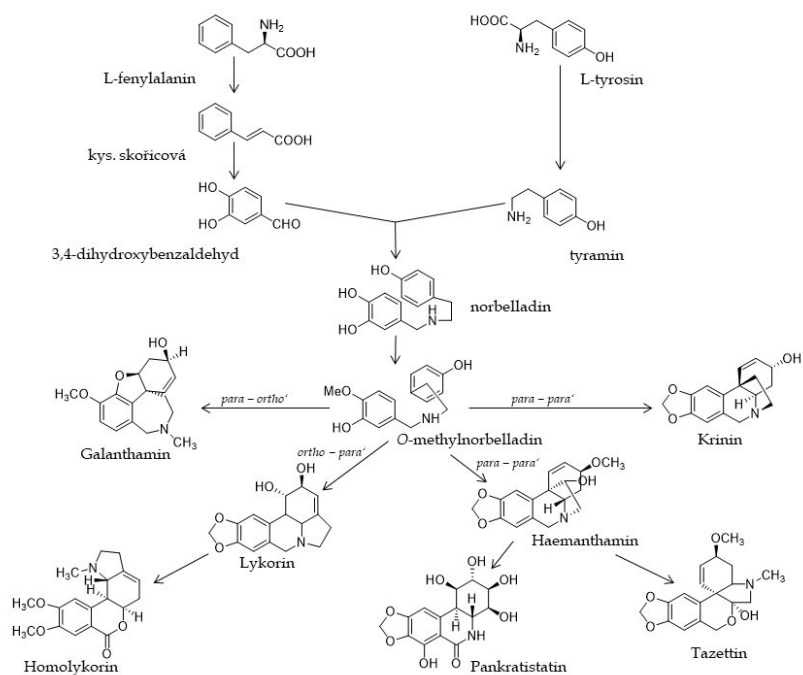
3.1.2 AmA a jejich biosyntéza

AmA vznikají tzv. norbelladinovou cestou¹⁷ (obr. 1) a jejich biosyntéza vychází ze dvou AMK L-fenylalaninu a L-tyrosinu. V prvním stupni vzniká z těchto AMK 3,4-dihydroxybenzaldehyd a tyramin. Spojením meziproductů vzniká norbelladin a následně *O*-methylnorbelladin, což je klíčový meziproduct této biosyntetické dráhy. Podle způsobu oxidační cyklizace této látky vzniká osm základních strukturních typů AmA – norbelladinový (belladin), galanthaminový (galanthamin, narwedín), lykorinový (lykorin, galanthin), homolykorinový (homolykorin, hippeastrin), haemanthaminový (haemanthamin, epimaritidin), krininový (krinin, bulbispermin), tazettinový (tazettin, 3-epimakronin) a pankratistatinový (pankratistatin, narciklasin)¹⁸. Devátým základním strukturním typem je typ montaninový (obr. 2, montanin, pankracin), ale biosyntetická cesta vedoucí ke vzniku tohoto typu alkaloidů není zatím zcela objasněna. Dále je popsáno dalších 13 strukturních typů AmA, které ale bývají často zastoupeny pouze jedním alkaloidem. Mimo to byly v rodu *Narcissus* L. popsány sloučeniny vznikající spojením dvou různých strukturních typů. Příkladem těchto látek může být pallidiflorin kombinující galanthaminový a galantindolový strukturní typ nebo další heterodimerní sloučeniny narcipavlin, narcikachnin¹⁹ a narcimatulin²⁰. Zvláštní skupinou je mesembranový typ (mesembrin, joubertiamin), který byl doposud identifikován pouze ve dvou druzích rodu *Narcissus* L.¹⁹. Směsi alkaloidů v jednotlivých druzích čeledi Amaryllidaceae se mohou významně lišit. Některé druhy obsahují velmi heterogenní směs napříč všemi strukturními typy alkaloidů, na druhou stranu v některých druzích najdeme alkaloidy jednoho či dvou strukturních typů¹⁶.

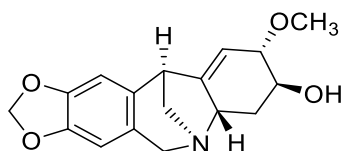
3.1.3 Rod *Narcissus* L.

Rod *Narcissus* L. jako řada jiných rodů (*Crinum* L., *Galanthus* L., *Haemanthus* L., *Lycoris* Herb., *Eucharis* Planch. & Lind. a další) patří do podčeledi Amaryllidoideae (amarylkové)⁹. Zástupce tohoto rodu je možno nalézt napříč Evropou, Asií a Severní Amerikou. Je známo okolo 50 volně rostoucích druhů, z nichž bylo vyšlechtěno na tisíce registrovaných odrůd²³. Podle velikosti pakorunky, množství a plnosti květů rozlišujeme 12 základních skupin narcisů, které se podle barvy pakorunky a okvětí dále dělí do podskupin²⁴. *Narcissus* cv. Professor Einstein, jehož fytochemická studie je předmětem této disertační práce, patří do skupiny dlouhokorunných narcisů s bílým okvětím a barevnou pakorunkou, u nichž pakorunka přesahuje jednu třetinu délky okvětních lístků, ale okvětí nepřesahuje^{25,26} (obr. 3).

Narcissus cv. Professor Einstein byl vyšlechtěn zejména z okrasných důvodů, ale mnoho takto vyšlechtěných kultivarů je zajímavým zdrojem celé řady AmA různých strukturních typů.



Obr. 1 Norbelladinová biosynetická cesta AmA^{21,22}.



Obr. 2 Montanin.

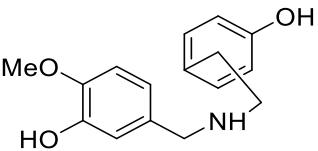
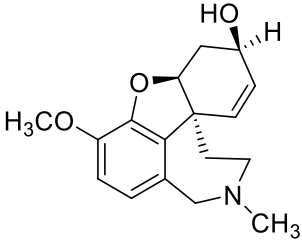
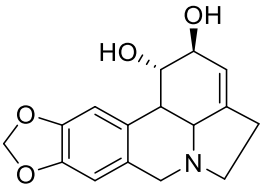


Obr. 3 *Narcissus* cv. Professor Einstein^{27,28}.

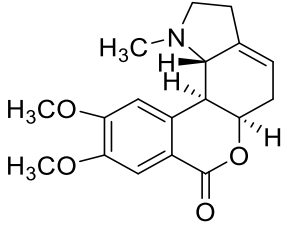
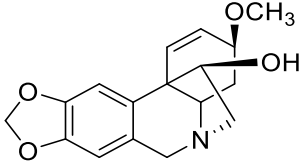
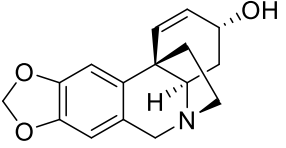
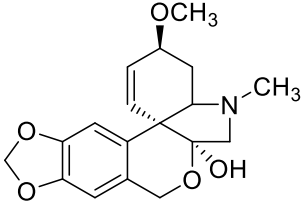
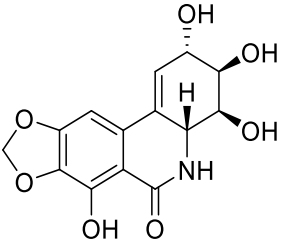
3.1.3.1 Alkaloidy izolované z rodu *Narcissus* L.

V roce 1999 bylo známo 82 alkaloidů izolovaných z rodu *Narcissus* L. a v dnešní době jich díky stále se zlepšující citlivosti analytických metod známe o mnoho více. Většina z oněch 82 popsaných alkaloidů patřila do základních devíti strukturních typů, ale nyní jsou známy i dimerní sloučeniny^{20,29}, které byly zmíněny výše (struktura pallidiflorinu uvedena v tab. 1). V tab. 1 jsou alkaloidy zastoupené v rodu *Narcissus* L. rozděleny podle strukturních typů.

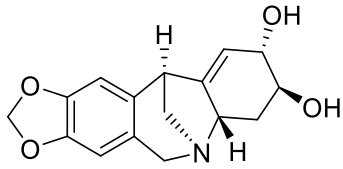
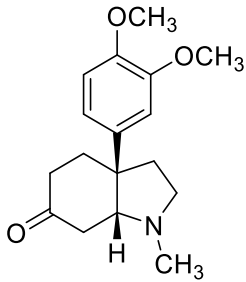
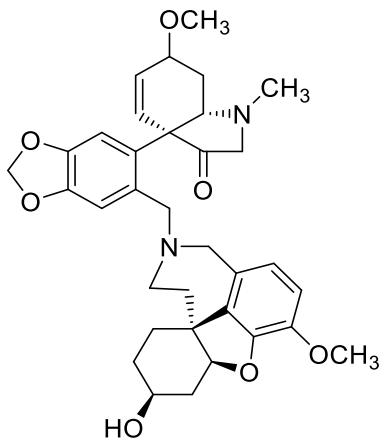
Tab. 1 Vybraní zástupci Amaryllidaceae alkaloidů jednotlivých strukturních typů izolovaných z rodu *Narcissus* L.³⁰.

Strukturní typ ^a	Hlavní zástupci	Druhy rodu <i>Narcissus</i>
Norbelladinový 	<i>O</i> -Methylnorbelladin	<i>N. pseudonarcissus</i> L.
Galanthaminový 	Galanthamin Narwedín Lykoramin Norlykoramin Epinorgalanthamin	<i>N. poeticus</i> L. <i>N. cyclamineus</i> DC. <i>N. cyclamineus</i> DC. cv. February Gold <i>Narcissus</i> L. cv. Ice Follies <i>N. leonensis</i> Pugsley
Lykorinový 	Lykorin Galanthin Karanin Pluviin Norpluviin Narcissidin	<i>N. leonensis</i> Pugsley <i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Grand Maître <i>Narcissus</i> L. cv. Ice Follies <i>Narcissus</i> L. cv. Twink <i>Narcissus</i> L. cv. Texas <i>N. tazetta</i> L.

Tab. 1 pokrač. Vybraní zástupci Amaryllidaceae alkaloidů jednotlivých strukturních typů izolovaných z rodu *Narcissus*³⁰.

<p>Homolykorinový</p> 	<p>Homolykorin 9-<i>O</i>-Demethylhomolykorin Masonin Hippeastrin Odulin</p>	<p><i>N. eugeniae</i> Fdez. Casas <i>N. bicolor</i> L. <i>N. tazetta</i> L. <i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Carlton <i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Carlton</p>
<p>Haemanthaminový</p> 	<p>Haemanthamin Haemanthidin Maritidin 8-<i>O</i>-Demethylmaritidin Vittatin</p>	<p><i>N. pseudonarcissus</i> L. <i>N. tazetta</i> L. <i>N. tazetta</i> L. var. <i>chinensis</i> Roem <i>N. primigenius</i> (Lainz) Fdez. Casas and Lainz <i>N. cantabricus</i> DC.</p>
<p>Krininový</p> 	<p>Krinin</p>	<p><i>Narcissus</i> L.³¹</p>
<p>Tazettinový</p> 	<p>Tazettin Pretazettin 3-Epimakronin</p>	<p><i>N. bujei</i> (Fdez. Casas) Fdez. Casas, <i>N. cantabricus</i> DC. <i>N. bicolor</i> L., <i>N. tazetta</i> L. <i>N. bicolor</i> L.</p>
<p>Pankratistatinový</p> 	<p>Narciklasin Ismin</p>	<p><i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Golden Harvest <i>N. bicolor</i> L.</p>

Tab. 1 pokrač. Vybraní zástupci Amaryllidaceae alkaloidů jednotlivých strukturních typů izolovaných z rodu *Narcissus*³⁰.

<p>Montaninový</p> 	Pankracin	<i>N. poeticus</i> L.
<p>Mesembranový</p> 	Mesembrenon	<i>N. pallidus</i> Graells
<p>Pallidiflorinový</p> 	pallidiflorin	<i>N. pallidiflorus</i> Pugsley

^a vzorec ve sloupci Strukturní typ představuje vždy prvního jmenovaného zástupce daného typu.

3.2 Civilizační onemocnění

Mezi civilizační onemocnění řadíme chronická nepřenosná onemocnění – tedy onemocnění, která nelze přímo přenést z jednoho člověka na druhého (nepočítáme-li genetické mutace). Mezi tato onemocnění patří mimo jiné onemocnění kardiovaskulárního systému, hypercholesterolemie, diabetes mellitus, cévní mozková příhoda, chronická onemocnění dýchacího traktu, chronické selhání ledvin, ale i nádorová onemocnění a Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba. Podle dat WHO z roku 2018 zemře na tato onemocnění 41 milionů lidí ročně, což je přibližně 71 % všech úmrtí na světě^{7,8}.

3.2.1 Alzheimerova choroba

AD je multifaktoriální, progresivní, ireverzibilní, neurodegenerativní onemocnění napadající zejména oblasti mozku spojené s kognitivními funkcemi. V roce 2018 bylo na světě přibližně 50 milionů pacientů s diagnózou AD a má se za to, že do roku 2050 bude těchto pacientů více než třikrát tolik – cca 152 milionů³². Jedná se o nejčastěji se vyskytující typ demence, která se zhoršuje s věkem a průměrná doba trvání od výskytu prvních příznaků do úmrtí pacienta je přibližně 8,5 roku³³. Čísla se liší v závislosti na autorovi, ale předpokládá se, že AD tvoří 60 – 80 % všech případů demence^{33,34}. Prevalence onemocnění je vyšší u žen, které tvoří přibližně dvě třetiny pacientů s AD, a není to dáno pouze skutečností, že se ženy průměrně dožívají vyššího věku. U žen je také rychlejší přechod od mírného kognitivního deficitu k diagnostikované AD a také progresi k pozdějším stádiím onemocnění³⁴. Hlavními projevy AD je zapomínání, poruchy orientace, vnímání aktuální situace, později agitace nebo naopak apatie, halucinace, agresivita a v pozdních stádiích i inkontinence. Dokud si pacient uvědomuje svou situaci, je onemocnění AD často doprovázeno i depresí³⁵.

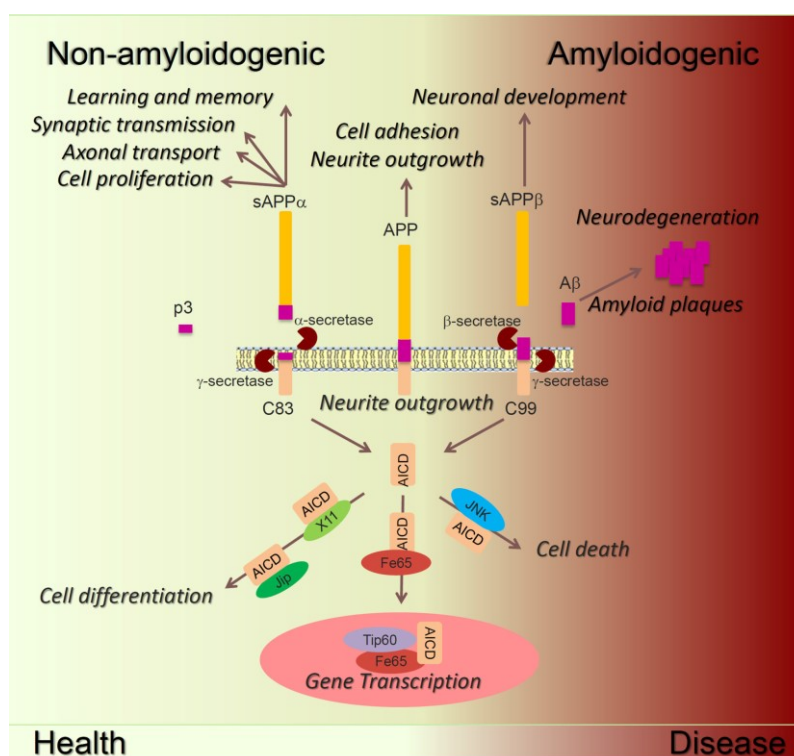
Jak již bylo zmíněno, je AD multifaktoriální onemocnění ovlivněné celou řadou činitelů, jako je životní styl, environmentální prostředí a v neposlední řadě i genetické predispozice (dědičná brzká forma AD tvoří přibližně 5 % všech případů)³⁶. Existuje řada teorií vzniku AD, z nichž některé střídavě získávají převahu, ale žádná z nich samostatně nevysvětluje všechny popsané patofyziologické a patobiochemické projevy onemocnění.

3.2.1.1 Teorie amyloidní kaskády

Tato teorie staví na první místo v příčinách vzniku AD zvýšenou agregaci a sníženou clearance extracelulárního $A\beta$ v některých částech mozku (mozková kůra, amygdala, hipokampus)³⁷, v nichž následně dochází k významně vyššímu numerickému úbytku neuronů, než doprovází pouhé stárnutí. Amyloid vzniká štěpením APP a délka peptidu se liší podle způsobu štěpení. $A\beta$ vzniká ve dvou isoformách $A\beta_{1-40}$ a $A\beta_{1-42}$, z nichž druhá jmenovaná má výrazně sníženou rozpustnost a tvoří tzv. alzheimerovské nebo též senilní plaky³⁸. APP je transmembránový glykoprotein s velkou extracelulární N-terminální doménou a krátkým intracelulárním C-koncem. Ektodoména APP obsahuje řadu subdomén a může fungovat jako receptor^{39,40} – např. pro vazbu heparinu, mít neuroprotektivní účinek, figurovat v signalizační apoptotické kaskádě⁴¹ a dalších procesech. Prozatím je popsáno šest cest³⁸, jimiž může být APP metabolizován. Nejvýznamnější z nich jsou dvě: štěpení α -sekretasou nebo β -sekretasou v obou

případech následované štěpením γ -sekretasou. Podle vzniklých produktů dělíme zpracování APP na neamyloidogenní (prospěšné) a amyloidogenní (škodlivé, obr. 4).

Ektodoména je nejprve α -sekretasou štěpena na solubilní APP- α fragment (sAPP α) a C-terminální fragment (CTF α), který je stále ukotven v buněčné membráně a čítá 83 AMK⁴². Štěpné místo pro α -sekretasu leží v A β doméně, tudíž tato cesta nevede ke vzniku A β . Uvolněný sAPP α fragment je transportován do extracelulárního prostoru, zatímco CTF α podléhá dalšímu štěpení γ -sekretasou, při němž vznikají dva produkty⁴³. Jedním z nich je malý extracelulární peptid p3 a druhým cytosolová intracelulární APP doména (AICD). Má se za to, že sAPP α i AICD mají další role, ale tyto ještě nebyly uspokojivě popsány⁴⁴.



Obr. 4 Schéma štěpení APP α - a β -sekretasou⁴⁰.

Druhá cesta štěpení APP začíná β -sekretasou (BACE1) za vzniku sAPP β a CTF β , přičemž sAPP β je o něco kratší než sAPP α , takže A β doména zůstane celá. Po následném štěpení CTF β γ -sekretasou vzniká A β a AICD. γ -Sekretasa může z CTF β odštěpit A β o délce 37–43 AMK. Za fyziologických podmínek převládá A β ₁₋₄₀, ale jak již bylo zmíněno, rozpustnost A β ₁₋₄₂ je mnohem nižší, zatímco toxicita vyšší⁴⁵. γ -Sekretasa se v organismu účastní celé řady pochodů a její inhibice není možná bez řady závažných vedlejších účinků⁴⁶, takže zůstává pouze možnost inhibovat BACE1.

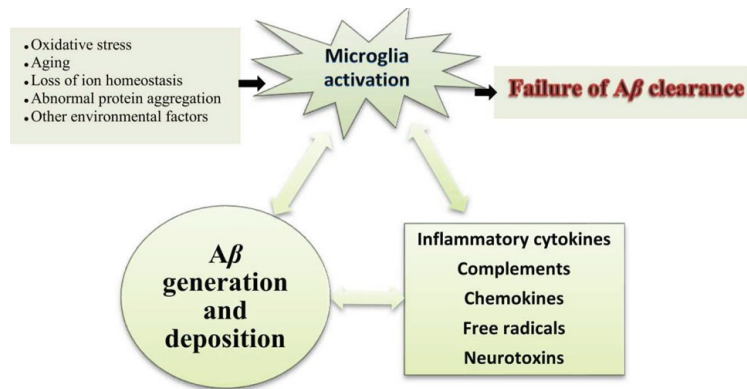
Třetí alternativní cestou štěpení APP je η -sekretasa následovaná cestou 1 nebo 2⁴⁷. APP se skládá z 639 až 770 AMK (podle isoformy)⁴⁸ a η -sekretasa ho štěpí za AMK 504 za vzniku sAPP η a CTF η . CTF η je dále štěpen α - nebo β -sekretasou na solubilní peptid A η - α a CTF α , respektive na A η - β a CTF β . CTF α nebo CTF β dále podléhají štěpení γ -sekretasou (viz výše). Enzym zodpovědný za η štěpení APP je membránová metaloproteasa (MT5-MMP)⁴⁹.

Čtvrtý způsob metabolizace APP je štěpení δ -sekretasou (asparagin endopeptidasa) následované cestou 1 nebo 2. Tento enzym může štěpit APP na dvou různých místech – za Asp 373 nebo Asp 585⁵⁰. Působením δ -sekretasy může vzniknout celá řada produktů. Při štěpení za Asp 373 vzniká sAPP₁₈₋₃₇₃ a CTF₃₇₄₋₆₉₅. δ -sekretasa také může štěpit APP nebo CTF₃₇₄₋₆₉₅ za Asp 585 za vzniku CTF₅₈₆₋₆₉₅ a sAPP₁₈₋₅₈₅ nebo sAPP₃₇₄₋₅₈₅. Oba vzniklé CTF fragmenty jsou dále štěpeny α - nebo β -sekretasou³⁸.

Další alternativní cestou je štěpení θ -sekretasou též označovanou jako BACE2 (homologie s BACE1 je 75%). Tento enzym štěpí APP blíž k C-konci za fenylalaninem 615. Místo θ štěpení leží v oblasti A β , proto ho tato cesta neprodukuje. CTF θ je dále štěpen γ -sekretasou na netoxický P3 a AICD⁵¹.

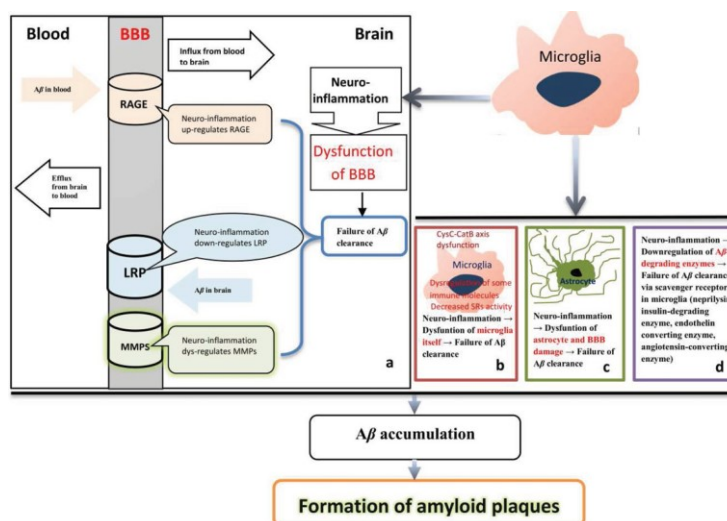
Posledním šestým způsobem štěpení je štěpení meprinem β a následně γ -sekretasou. Meprin β je metaloproteasa a někdy je též nazýván alternativní β -sekretasou. Meprin β štěpí APP na několika místech, přičemž je většina produktů netoxická, ale může vzniknout i A β ₂₋₄₂ (první AMK chybí)³⁸.

Pokud některou z amyloidogenních cest A β vznikne, shlukuje se a tvoří plaky. Ty rozlišujeme na neuritické (A β jádro a neurity s párovými spirálními vlákny typické pro AD); tzv. vyhořelé plaky („hrudky“ A β v korových oblastech, globus pallidus a mozečku); plaky s denzním A β jádrem (provázejí běžné stárnutí, obsahují dystrofické neurity); tzv. difúzní plaky (neobsahují neurity); difúzní plaky s dystrofickými neurity a volné dystrofické neurity a neurity s párovými spirálními vlákny³⁷. Agregáty A β aktivují a shlukují u sebe mikroglie (vysoce pohyblivé fagocytující makrofágy CNS), které primárně slouží k odstranění cizorodých látek z CNS a hrají roli ve vrozené imunitní reakci. Při aktivaci mikroglíí A β dojde ke spuštění kaskády produkce prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α), volných kyslíkatých a dusíkatých radikálů (ROS, RNS) a metabolitů mastných kyselin (eikosanoidy)⁵², což vede k porušení homeostázy v mozku a poškození neuronů³⁷. Zánětlivá reakce nahrává také vzniku depozit agregovaných proteinů včetně A β , čímž se roztáčí začarovaný kruh, neboť A β aktivuje mikroglie a spouští tak produkci prozánětlivých cytokinů, které naopak přispívají k tvorbě dalších amyloidních plaků (obr. 5)⁵³.



Obr. 5 Schéma bludného kruhu tvorby a ukládání Aβ chronické zánětlivé reakce⁵⁴.

V důsledku zánětlivé reakce dochází i porušení HEB, prostřednictvím které dochází za fyziologických podmínek k odstraňování Aβ z mozku do krve pomocí multifunkčních scavenger a signalizačních LRP-1 receptorů. Tyto receptory se ve velké míře vyskytují v buňkách endotelu krevních kapilár a jsou zodpovědné za odstraňování Aβ z mozku. Jako jejich antagonisté fungují RAGE receptory, vyskytující se na povrchu neuronů, mikroglíí, astrocytů a dalších buněk. Tyto receptory vycytávají z krve cirkulující Aβ a převádějí ho do mozku. Během zánětlivé reakce vyvolané aktivovanými mikroglíemi dochází ke snížení funkce LRP-1 a naopak ke zvýšení funkce RAGE receptorů (obr. 6), což vede ke značnému zhoršení clearance Aβ z CNS a ke zvýšené tvorbě plaků.

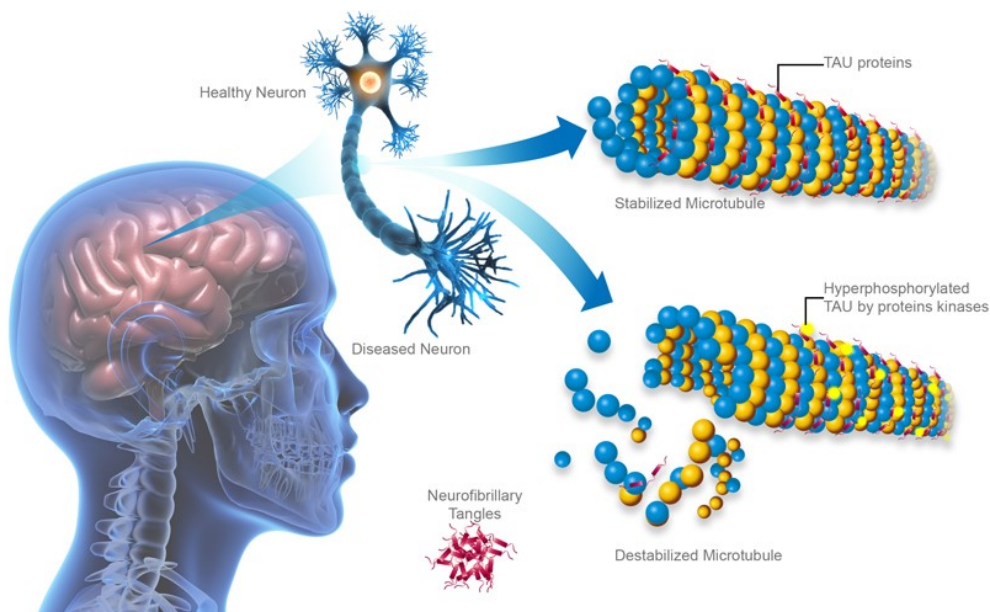


Obr. 6 Schéma selhání clearance Aβ působením mikroglíí a chronického zánětu v mozku (BBB = hematoencefalická bariéra; MMPs = matrixové metaloproteasy; LRP = low-density lipoprotein receptor, je zodpovědný za clearance Aβ; RAGE = receptor for advanced glycation endproducts, patří do nadrodiny imunoglobulinů, antagonistu LRP v clearance Aβ)⁵⁴.

Zvýšená aktivace RAGE vede mimo jiné i ke zvýšení oxidačního stresu a ke zhoršení vaskulární dysfunkce a ztrátě neuronálních funkcí⁵⁵. V metabolismu A β od vzniku z APP po clearance z mozku je několik míst, na která je možné zacílit při výzkumu nových léčiv v terapii AD – např. inhibice BACE1 nebo RAGE receptorů. LRP receptory nebo γ -sekretasu naopak vzhledem k jejich multifunkčnosti nelze bez závažných nežádoucích účinků zacílit. Z tohoto důvodu byla ve III. fázi zastavena klinická studie s semagacestatem (clinicaltrials.gov; NCT00594568), který působil jako inhibitor γ -sekretasy⁵⁶. Naopak crenezumab (NCT03491150), aducanumab (NCT02484547), gantenerumab (NCT02051608) jsou ve III. fázi klinických studií^{57,58}.

3.2.1.2 Hypotéza τ -proteinu

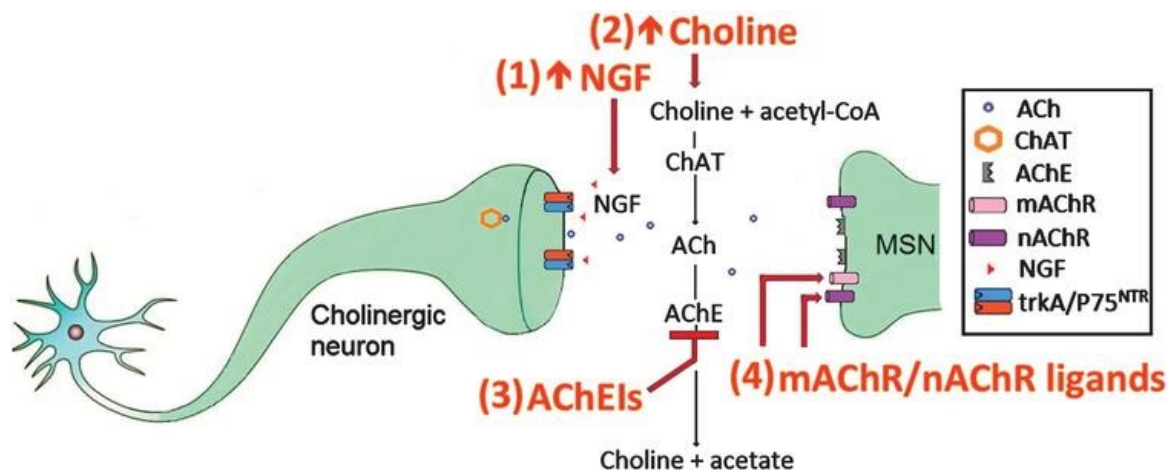
Druhou majoritní teorií vzniku AD je patofyziologie τ -proteinu – jeho hyperfosforylace a tvorba nerozpustných intracelulárních klubek. Podle některých teorií je hyperfosforylace τ -proteinu závislá na předchozí tvorbě A β ⁵⁹, podle jiných τ -protein předchází A β ^{60,61} nebo jsou na sobě tvorba extracelulárních amyloidních plaků a intracelulárních klubek (NFTs) nezávislé. Tau protein je fyziologicky rozpustný a je spjatý s mikrotubuly a vezikulárním transportem (obr. 7)⁶². Fosforylace a defosforylace τ -proteinu je regulována řadou kinas a fosfatů, z nichž jednou je i multifunkční GSK-3 β . GSK-3 β hraje významnou funkci v regulaci buněčného cyklu, diferenciaci a proliferaci buněk a v neposlední řadě i v regulaci genové exprese⁶³. Zvýšená aktivita GSK-3 β může vést k rozvoji AD, zhoubného bujení⁶⁴, diabetu⁶⁵ a dalších onemocnění. Při hyperfosforylaci dojde k poškození funkce a změnám konformace τ -proteinu, což vede ke snížení jeho rozpustnosti a afinity k mikrotubulům⁶⁶, neboť začne tvořit vlákna, jež agregují v NFTs, čímž ruší axonální transport⁶². Hyperfosforylovaný τ -protein blokuje normální metabolismus neuronů, to vede k jejich odumírání a tvorbě lézí, přičemž jejich rozsah koreluje s rozvojem AD lépe než množství A β ^{60,66}. V každém případě je potřeba cílit léčbu na oba tyto patologické agregáty, neboť jejich negativní působení v CNS se vzájemně doplňuje a zesiluje. Nejaktuálněji se touto problematikou zabývá klinická studie NCT01315639⁶⁷, jejíž dílčí výsledky byly shrnuty nedávno (Duron E. et al., 2018⁶⁸).



Obr. 7 Schéma fyziologického a patofyziologického působení τ -proteinu⁶⁹.

3.2.1.3 Cholinergní teorie

Tato teorie byla dlouhou dobu hlavní teorií o vzniku AD, neboť ACh mimo jiné souvisí s učením a pamětí⁷⁰. Postupně ale bylo zjištěno, že změny v metabolismu ACh (Obr. 8) nemohou mít na svědomí všechny změny a příznaky spojené s AD. Vzhledem ke skutečnosti, že téměř všechna léčiva v současnosti používaná v terapii AD jsou inhibitory AChE, je tato teorie stále důležitá a aktuální, ačkoliv již nepatří do úplně první linie výzkumu³³. Při AD dochází k poruše metabolismu ACh na několika úrovních – pokles ChAT⁷¹, snížení zpětného vychytávání cholinu⁷² a tvorby ACh⁷³. Pokles aktivity ChAT a tvorby ACh se projevuje zejména v počátečním stadiu AD, což vede k poklesu kognitivních funkcí pacienta⁷⁴, neboť dojde ke zhoršení nervového přenosu a posléze i ztrátě cholinergních neuronů. V současné době není v běhu žádná klinická studie zabývající se novými inhibitory cholinesteras – AChE ani BuChE. Funkce BuChE je za fyziologických podmínek spíše podpůrná a nabývá na významu v pozdějších stadiích AD⁷⁵, kdy klesá množství a aktivita AChE až o 75 %. Její roli s narůstající intenzitou (nárůst o 40 – 90 %) přebírá BuChE a poměr BuChE:AChE v korových oblastech zasažených AD se může změnit z ~ 0,6 až na 11⁷⁶. Z těchto důvodů by bylo zajímavé a žádoucí najít látku, která by byla duálním inhibitorem obou těchto enzymů, neboť zatím je v terapii pouze jeden – rivastigmin (Exelon®, aj.)⁷⁷. Na významu také nabývá selektivní inhibice BuChE u pokročilejších stadií AD⁷⁸.



Obr. 8 Schéma metabolismu ACh (ACh – acetylcholin, ChAT = cholinacetyltransferasa, AChE = acetylcholinesterasa, mAChR = muskarinový ACh receptor, nAChR = nikotinový ACh receptor, NGF = nervový růstový faktor, trkA/P75 = receptor pro tyrosinkinazu/receptor p75)⁷⁹.

3.2.1.4 Glutamatergní systém a jeho vliv na rozvoj AD

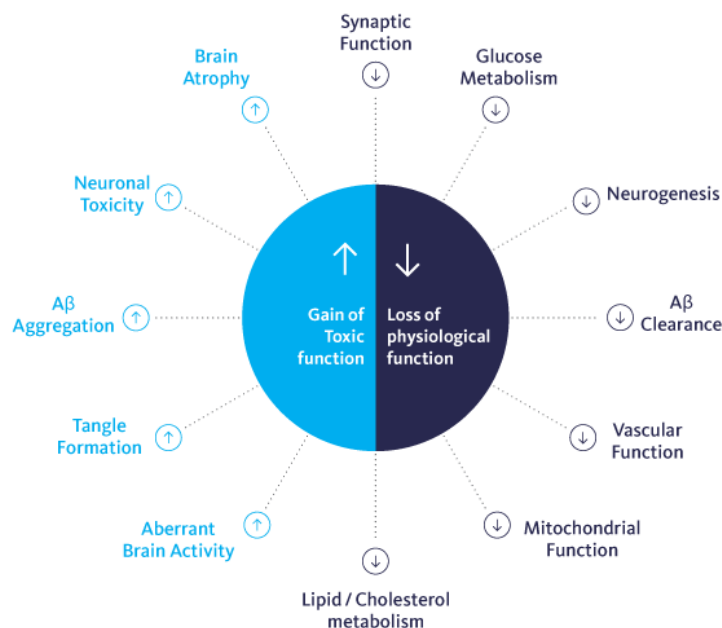
Glutamatergní systém je systém excitačních AMK v mozku, z nichž glutamát je kyselinou nejrozšířenější. Tento systém neuromediátorů hraje velmi důležitou roli v procesu učení a vytváření paměťových stop. Metabolických cest vedoucích k syntéze glutamátu v CNS je celá řada a jeho koncentrace v některých částech mozku může být vysoká. Zbylý glutamát je na synapsi vychytáván pomocí glutamát uptake/transportního systému. Excitační neurotransmise zprostředkovaná glutamátem probíhá prostřednictvím vazby na ionotropní glutamátové receptory, z nichž nejvýznamnější jsou *N*-methyl-D-aspartátové receptory (NMDAR), kainátové receptory a (*S*)-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-izoxazolepropionové (AMPA) receptory. Stimulace NMDAR glutamátem je spojena se vstupem Ca^{2+} iontů do neuronů a jejich následnou tzv. dlouhodobou potenciací⁸⁰. Má se za to, že NMDAR jsou nezbytné pro přežití neuronů, ale blokáda jejich funkce vede naopak k degeneraci a apoptóze nervových buněk⁸¹. Bylo zjištěno, že existují dva typy NMDAR. Prvním typem jsou NMDAR synaptické – ty mají na starosti přežití neuronů, naopak extrasynaptické NMDAR – resp. jejich nadměrná stimulace vede k rozvoji excitotoxicity a následně k apoptóze neuronů⁸². Glutamatergní neurony se vyskytují hlavně v mozkové kůře, amygdalách, bazálních gangliích a hipokampu. Právě korové oblasti, amygdaly a hipokampus bývají při AD významně zasaženy, takže v pozdějších stádiích onemocnění dochází mimo jiné i k postižení funkce systému excitačních AMK a jejich zvýšené produkci. Ta vede ke vzniku velkého množství šumů a v důsledku toho ke zhoršení přenosu správných signálů mezi neurony⁸³. Navíc je působením jednoho z fragmentů Aβ zhoršeno i zpětné vychytávání glutamátu, což v důsledku zvýšené koncentrace Ca^{2+} iontů v neuronu vede

k excitotoxicitě (tvorbě volných radikálů, poškození mitochondrií a poškození chromatinu) a apoptóze buňky^{84,85}.

3.2.1.5 Genetické příčiny

V současné době bylo identifikováno 67 mutací genu pro APP, 230 mutací genu pro presenilin 1 (PSEN1) a 39 mutací genu pro presenilin 2 (PSEN2), z nichž některé nejsou patogenní, jiné ano a u některých jejich vliv na rozvoj AD zatím nebyl prokázán a objasněn^{86,87}. Tyto mutace jsou autosomálně dominantně dědičné a často zodpovědné za brzkou formu AD. Tato brzká forma AD, též nazývaná familiální AD (FAD), představuje přibližně 5 % všech případů AD a jejím hlavním znakem je vypuknutí nemoci před 65. rokem věku⁸⁸. Některé mutace mohou být i protektivní (APP A673T) a snižují produkci A β až o 20 %, ale u většiny známých mutací je to naopak⁵⁶. Mutace spojené s APP vedou ke zvýšení tvorby A β a mají za následek přibližně 10 % případů FAD, z nichž významnou skupinu tvoří lidé s Downovým syndromem, kteří díky trisomii 21. chromosomu mají ve svém genomu tři kopie genu pro APP. U těchto pacientů je výrazně zvýšena produkce A β . U lidí s Downovým syndromem jsou amyloidní plaky detekovatelné již mezi 20. a 30. rokem života a později ve středním věku dochází i k tvorbě NFTs, jejichž množství koreluje s rozvojem kognitivního deficitu^{89,90}. Zbýlých 90 % pacientů s FAD tvoří lidé s mutací PSEN. Některé z nich způsobují AD, bez zásahu do tvorby amyloidních plaků nebo změny poměru A β ₁₋₄₀ a A β ₁₋₄₂, ale mohou zvyšovat jejich celkovou produkci. V neposlední řadě bylo identifikováno i několik mutací měnících expresi τ -proteinu, které mají za následek zhoršenou interakci τ -proteinu s mikrotubuly a následně zvýšenou agregaci a vznik NFTs. Zatím bylo identifikováno celkem 80 mutací v oblasti genu pro τ -protein (MAPT) na 17. chromozomu. Přitom je však potřebné zvážit, že ne všechny mutace τ -proteinu souvisejí s AD - řada z nich je asociována s Parkinsonovou chorobou nebo frontotemporální demencí^{56,91}.

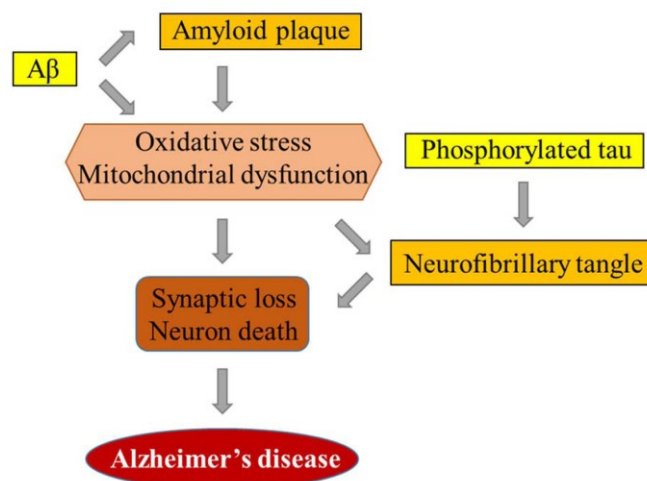
Dalším geneticky podmíněným faktorem, který se podílí na rozvoji AD je výskyt alely ϵ 4 pro apolipoprotein E (ApoE- ϵ 4). ApoE se může vyskytovat ve třech isoformách – ApoE2, ApoE3 (nejčastější, cca 78 % populace) a ApoE4. Tyto isoformy se liší pouze ve dvou AMK, ale právě isoforma ApoE4 významně zvyšuje riziko rozvoje pozdní formy onemocnění. Přítomnost této alely zvyšuje riziko rozvoje AD u heterozygotů 3 \times a u homozygotních jedinců až 15 \times oproti běžné populaci. ApoE má v mozku řadu funkcí a patří mezi ně i schopnost vázat A β , která je přítomností alely ϵ 4 omezena, což vede k nárůstu koncentrace A β v mozku, ale i k dalším nepříznivým účinkům viz obr. 9^{36,37,89,90}.



Obr. 9 Vliv přítomnosti isoformy ApoE4 v mozku⁹².

3.2.1.6 Ostatní příčiny vzniku AD

Vedle hlavních již zmíněných teorií vzniku AD se na rozvoji tohoto onemocnění podílí i řada dalších jevů. Prvním z nich je stárnutí – to je, zejména na buněčné úrovni, spojeno s hromaděním produktů oxidačního stresu, poruchou mitochondriálních funkcí, zhoršením reparace DNA a sníženou regenerací tkání⁹³. Vnějšími faktory rozvoje AD může být i životní prostředí – resp. výskyt těžkých a jiných kovů (Pb, Hg, Al, Cu, aj.) a pesticidů, které mohou negativně ovlivňovat neuronální funkce^{94,95}. Vliv mohou mít také těžká zranění nebo infekce mozku v anamnéze⁹⁶. Dalším z mnoha potenciálních faktorů (obr. 10) je mitochondriální (MTCH) dysfunkce, kdy dochází k postižení energetického metabolismu buněk. Může být zasažena MTCH morfologie, bioenergetika a také MTCH transport, což může vést k ukládání A β a τ -proteinu a poškození přenosu na synapsi⁹⁷. Svoji roli během rozvoje AD hraje i oxidační stres a ROS/RNS, které při nesprávné funkci antioxidačních mechanismů v těle poškozují DNA, proteiny a lipidy a aktivují apoptózu nebo autofagii⁹⁸.



Obr. 10 Schéma návaznosti rizikových faktorů podílejících se na rozvoji AD⁸⁰.

3.2.1.7 Léčiva v terapii AD

V současné době se v terapii AD využívají čtyři hlavní léčiva - galanthamin, donepezil a rivastigmin patřící mezi inhibitory cholinesteras. Posledním používaným léčivem je memantin, který působí jako inhibitor NMDAR. Mimo farmakologické léčby se používá trénink paměti, aktivizace pacienta, ergoterapie a jiné nefarmakologické metody⁹⁹.

Inhibitory cholinesteras zpomalují prohlubování kognitivního deficitu (zhoršování paměti, orientace, schopnosti racionálně plánovat) u pacientů v mírném stadiu AD, proto se těmto látkám souhrnně říká kognitiva. Tato léčiva inhibují AChE a v případě rivastigminu i BuChE, čímž se zvyšuje koncentrace ACh na synapsi a zlepšuje se přenos nervových signálů. Při podávání kognitiv zároveň dochází ke snížení tvorby Aβ, současně i jeho toxicity a k celkovému zpomalení progresu onemocnění¹⁰⁰. V současné době probíhá několik klinických studií zabývajících se zlepšením kognitivního deficitu po podání inhibitorů cholinesteras pacientům se schizofrenií¹⁰¹.

Galanthamin (Reminyl[®], Razadyn[®], Galantamin Mylan[®])

Galanthamin (obr. 11A) je jedním z AmA majoritně zastoupených v rostlinném materiálu – ve velkém množství se vyskytuje např. v rodech *Galanthus* L., *Leucojum* L. nebo *Narcissus* L.¹⁴. Galanthamin disponuje řadou biologických účinků, ale v současné době je využíván pouze k léčbě mírné až středně těžké demence Alzheimerova typu¹⁰². Kromě inhibice AChE galanthamin působí i jako allosterický modulátor pre- i postsynaptických nikotinových receptorů pro ACh, což vede ke zvýšení afinity ACh k těmto receptorům a zlepšení cholinergní transmise. Snášitelnost galanthaminu pacienty je relativně dobrá a většina jeho nežádoucích

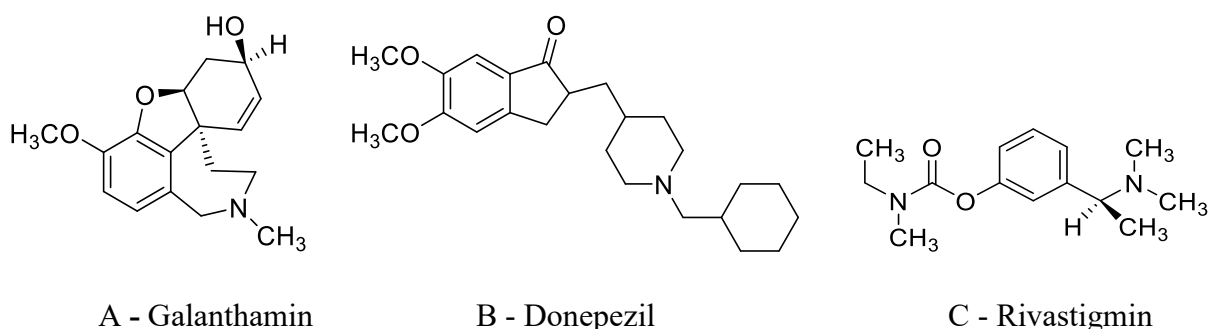
účinků není nijak závažná. Nežádoucí účinky souvisí s periferními cholinergními projevy galanthaminu a patří mezi ně např. nevolnost, zvracení, průjemy, bolesti hlavy, závratě, poruchy spánku nebo třeba neklid¹⁰³. V průběhu užívání galanthaminu se může objevit také kolísání krevního tlaku, ale nebyly zaznamenány žádné výraznější změny, které by pacienty negativně ovlivňovaly¹⁰⁴.

Donepezil (Alzil[®], Aricept[®], Donpethon[®], Kognezil[®])

Donepezil je piperidinový derivát (obr. 11B) používaný výhradně k léčbě mírné až středně těžké demence Alzheimerova typu. Jedná se o selektivní inhibitor AChE (má k ní přibližně 1000× vyšší afinitu než k BuChE). S mechanismem jeho účinku souvisejí i případné vedlejší účinky, jako je mimo jiné bolest hlavy, nevolnost, průjem, zvracení, vyrážka, svalové křeče a zvýšená únava¹⁰⁵.

Rivastigmin (Exelon[®], Nimvastid[®])

Rivastigmin je karbamátový derivát (obr. 11C) a jediný používaný duální inhibitor AChE i BuChE. Kromě léčby mírné až středně těžké demence Alzheimerova typu je podle SPC možné ho indikovat i při mírné až středně závažné demence u pacientů s idiopatickou Parkinsonovou chorobou^{106,107}. Mezi možné vedlejší účinky rivastigminu patří např. ztráta chuti k jídlu, neklid, noční můry, úzkost, závratě, nauzea, zvracení nebo průjem⁷⁷.



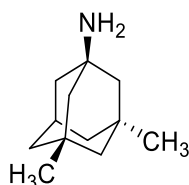
Obr. 11 Inhibitory cholinesteras využívané v terapii AD.

Z inhibitorů NMDAR je v léčbě zatím využíván pouze memantin.

Memantin (Ebixa[®], Mantomed[®], Memixa[®], Memolan[®])

Memantin je používán v léčbě pacientů se střední až těžkou formou Alzheimerovy choroby. Jedná se o derivát adamantanu (obr. 12), který blokádu iontového kanálu spojeného

s NMDAR, omezuje aktivitu glutamatergního systému. Tento účinek vede ke snížení excitotoxického působení nadměrného množství glutamátu, čímž přispívá ke správnému šíření nervových vzruchů a snížení šumu. Mezi časté nežádoucí účinky memantinu patří somnolence, závratě a poruchy rovnováhy, hypertenze, dyspnoe, zácpa a bolest hlavy¹⁰⁸.



Obr. 12 Inhibitor NMDAR – memantin.

3.2.1.8 Adjuvantní terapie AD

Huperzin A

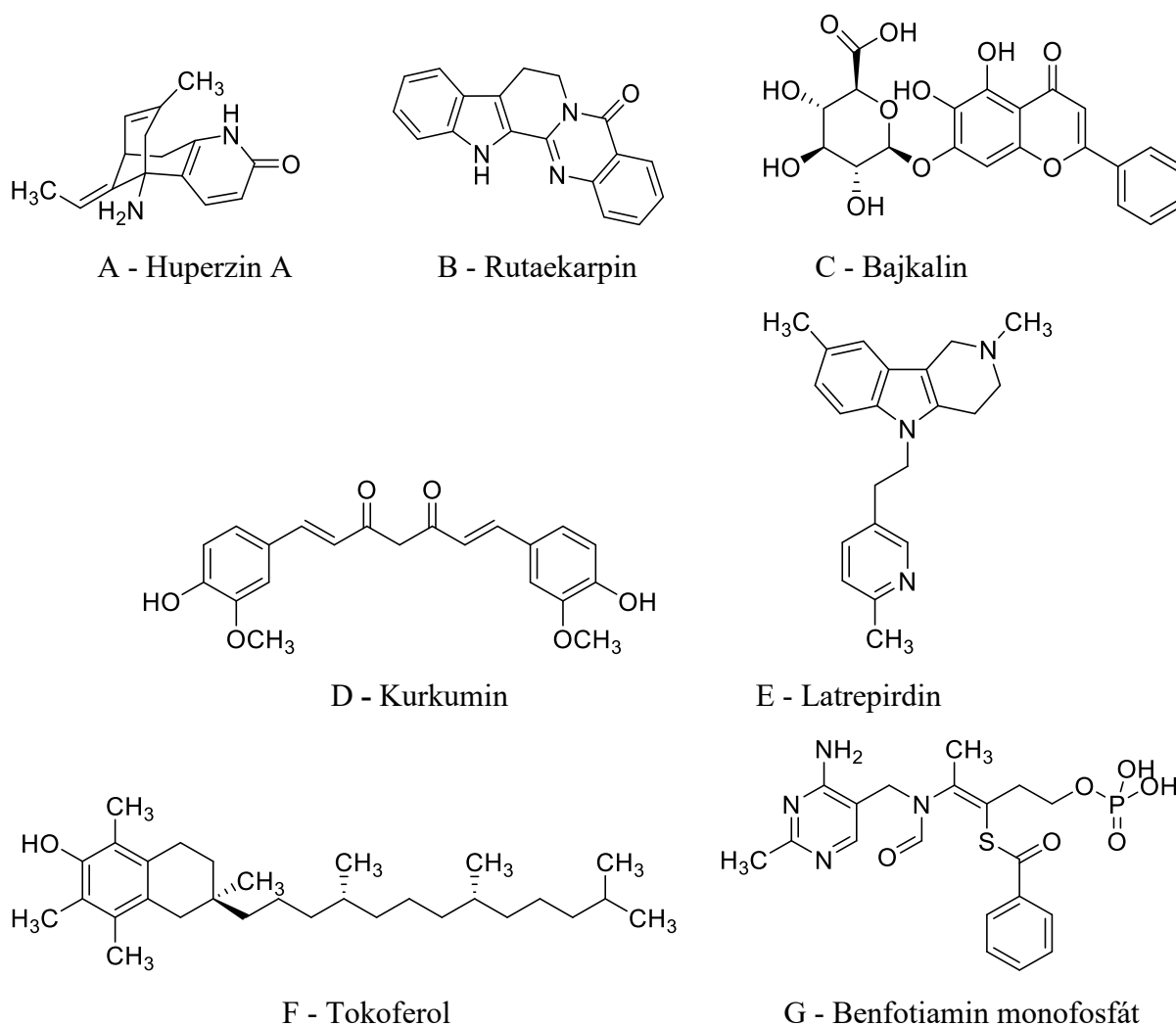
Tento pyrrolizidinový alkaloid (obr. 13A) je izolován z vrance pilovitového (*Huperzia serrata*, Huperziaceae)¹⁰⁹, ale je možné ho najít i v čeledi Lycopodiaceae a rodu *Selaginella*¹¹⁰. Huperzin A rychle přechází přes HEB, díky čemuž má méně periferních nežádoucích účinků než galanthamin, a působí jako reverzibilní selektivní inhibitor tetramerní G4 isoformy hAChE (ostatní látky inhibují i G1 isoformu), což vede ke zpomalení progresu AD. Huperzin A se vyznačuje i antioxidačními vlastnostmi, čímž mírní i neurotoxické působení A β způsobené indukci tvorby ROS v mozku, a působí i jako antagonist NMDA receptorů a snižuje excitotoxicitu vyvolanou nadměrným působením glutamátu.

V Číně se *Huperzia serrata* používá jako součást tradiční medicíny, ale podle FDA¹¹¹ a Pharmazeutische Stoffliste 2018¹¹² není registrován jako léčivo v USA ani v Evropě. U nás je součástí doplňků stravy ve formě extraktu v kombinaci s dalšími rostlinnými extrakty.

Rutekarpin

Chinazolinokarbolinový alkaloid (obr. 13B) izolovaný z plodů stromu ampáku routoplodého (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae), které jsou déle než 2000 let využívány v rámci tradiční čínské medicíny. Rutekarpin je silným selektivním inhibitorem AChE a má i protizánětlivý a cytostatický účinek. Vzhledem k velkému množství nežádoucích účinků (stimulace CNS, halucinace) se rutekarpin v praxi nepoužívá¹¹³, ale slouží jako předlohová struktura pro přípravu semisyntetických derivátů^{109,114}.

Další potenciální látky pro adjuvantní terapii nejen AD, ale i dalších typů demence, schizofrenie nebo bipolární afektivní poruchy, mohou být inhibitory POP. POP je cytosolová serinová proteasa štěpící menší peptidy v místě AMK prolinu – jedná se např. o substanci P, vasopressin a některé neuropeptidy sloužící jako modulátory kognitivních funkcí. Inhibice POP vede tedy ke zvýšení jejich koncentrace a tím ke zpomalení progresu kognitivních funkcí¹¹⁵. Jedním z inhibitorů POP je fenolický derivát bajkalin (obr. 13C) izolovaný z kořene šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*, Lamiaceae)¹¹⁶. Inhibiční aktivita bajkalinu slouží jako jeden ze standardů pro testování inhibiční aktivity ostatních látek ($IC_{50} = 0,610 \pm 0,021$ mM). Dalším standardem používaným pro hodnocení inhibiční aktivity přírodních látek je berberin ($IC_{50} = 0,142 \pm 0,021$ mM)¹¹⁷. Z přírodních látek se jako zajímavý POP inhibitor v laboratorních podmínkách jeví 9-*O*-demethylgalanthin ($IC_{50} = 0,146 \pm 0,016$ mM)¹¹⁵. Mezi látky s inhibiční aktivitou vůči POP patří i deriváty prolylizoxazolu¹¹⁸.



Obr. 13 Látky s potenciálním účinkem v adjuvantní terapii AD.

Klinické testy s různými výsledky probíhají pro celou řadu dalších látek, jako jsou např. kurkumin (obr. 13D, *Curcuma longa*, Zingiberaceae) pro své antioxidační působení, stejně tak tokoferoly (obr. 13F, vylučování ROS), antihistaminikum latrepirdin (obr. 13E, Dimebon[®], úprava neuronálního metabolismu), extrakt z jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae), který podporuje působení inhibitorů cholinesteras v počátečních stádiích AD; lithium (zabraňuje degradaci τ -proteinu blokadou GSK-3 β receptoru)¹¹⁹ nebo benzoát sodný, který působí jako posilovač funkce NMDAR¹²⁰. V II. fázi klinických studií (NCT02292238) je momentálně ještě benfotiamin (obr. 13G, derivát vitamínu B1), jehož zvýšená koncentrace v mozku by měla zpomalit progresi kognitivního deficitu¹²¹.

3.2.2 Nádorová onemocnění

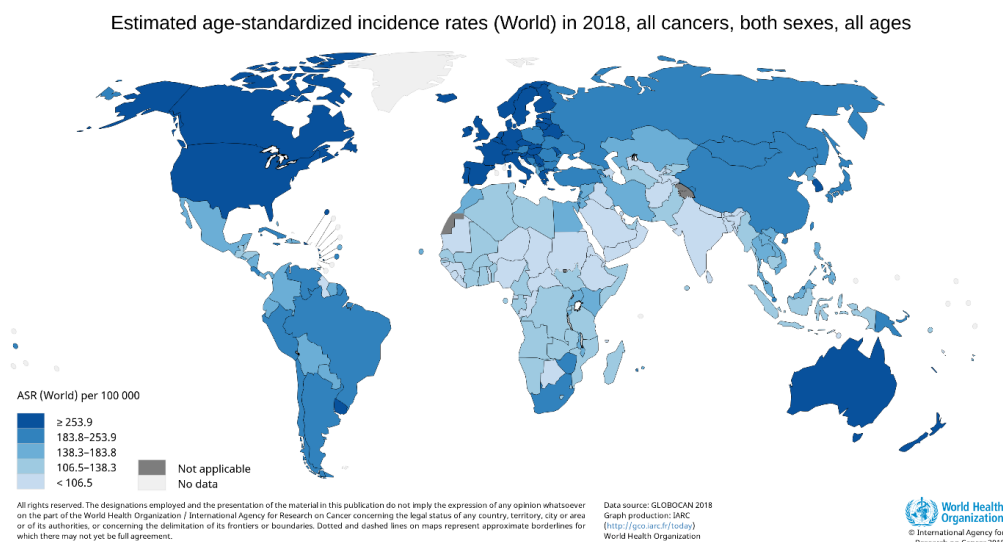
Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v západním světě (obr. 14) – během roku 2018 bylo podle WHO diagnostikováno 18 milionů nových případů a zaznamenáno kolem 9,5 milionů úmrtí¹²². Incidence rakoviny stoupá s věkem a výrazný vliv může mít pohlaví, etnikum, genetika nebo životní styl¹²³. Dnes pod pojmem rakovina/nádorové onemocnění rozlišujeme více než 100 různých onemocnění, z nichž každé je způsobeno jiným souborem genetických změn. Poměr uzdravených pacientů se díky přesnější diagnostice, zlepšení terapeutických strategií, jejich individualizaci a podpůrné péči zvyšuje.

Základní definice zní, že nádor je tkáň, která nadměrně roste nezávisle na regulačních mechanismech organismu¹²⁴. Nádorové buňky se v důsledku mutací proliferčních a antiproliferčních genů vymaní z regulace buněčného dělení a spuštění apoptózy a získává schopnost se bez omezení dělit. Mutace proliferčních genů (onkogenů) vede ke zvýšené expresi proteinů stimulujících buněčné dělení. Mutace antiproliferčních (za normálních podmínek tumor-supresorových) genů vede ke ztrátě zábrán v buněčném dělení. Nádorové buňky se dále nediferencují a další generace dědí mutace původní buňky¹²⁵, takže se tyto buňky dělí nezávisle na stimulech buněčného cyklu a rozšiřují se do okolních tkání.

Nádory dělíme na benigní a maligní. Benigní nádory rostou pomalu; jsou neinvazivní, opouzdřené a dobře diferencované; mají nízký mitotický index a obsahují málo dělících se buněk a nemetastazují. Naproti tomu maligní nádory rostou rychle; jsou špatně diferencované, invazivní a neopouzdřené; mají vysoký mitotický index a obsahují mnoho dělících se buněk a tvoří metastázy.

Podle typu tkáně, ze které nádory vznikají, rozlišujeme karcinomy (z epiteliálních buněk), adenokarcinomy (odvozuji se od tkáně žláz), sarkomy (nádory pojivových tkání), lymfomy (odvozeny z lymfatické tkáně) a leukemie (nádory vznikající z krvetvorných buněk).

Mezi tři nejpoužívanější způsoby léčby řadíme radioterapii, chemoterapii a chirurgické odstranění nádoru a jejich vzájemné kombinace. Chemoterapeutika můžeme podávat samostatně, ale i před chirurgickým zákrokem nebo po něm. Častým problémem se stává rozvoj rezistence nádorových buněk vůči používaným léčivům – často i proti léčivům s různým mechanismem účinku. Z těchto důvodů je důležité hledat stále nové látky s různými mechanismy účinku a co nejmenším množstvím vedlejších účinků¹²³.



Obr. 14 Distribuce nádorových onemocnění ve světě¹²⁶.

3.2.2.1 Přírodní látky v terapii nádorových onemocnění

Řada přírodních látek a od nich odvozených polosyntetických derivátů je v současné době klinicky využívána v léčbě široké škály nádorových onemocnění, proto je hledání nových cytostatik v rostlinné říši stále významným směrem výzkumu.

Paclitaxel (Taxol[®], Abraxane[®], Paclitaxel Ebewe[®])

Paclitaxel je alkaloid ze skupiny taxanů a je získáván z kůry tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*, Taxaceae)¹²⁷. Dále je paclitaxel připravován polosyntetickou obměnou 10-*O*-deacetylbaicatinu III získaného z jehlic tisu červeného (*Taxus baccata*, Taxaceae). Působí jako vřetenkový jed a brání tak dělení nádorových buněk. Používá se zejména v terapii karcinomu prsu a vaječníků, malobuněčného karcinomu plic a Kaposiho sarkomu¹²⁸.

Polosyntetickým derivátem paclitaxelu je docetaxel (Docetaxel Accord[®]), který se používá v terapii karcinomu prsu, prostaty, hlavy a krku, dále malobuněčného karcinomu plic a adenokarcinomu žaludku¹²⁹.

Catharanthus alkaloidy

Jde o indolové alkaloidy izolované z barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae). Tyto alkaloidy působí jako inhibitory polymerace mikrotubulů, což vede k zastavení buněčného dělení. Do uvedené skupiny řadíme vinkristin, vinblastin a jejich polosyntetické deriváty.

Vinkristin (Vincristine Teva[®]) se používá v terapii akutní lymfatické leukémie, Hodgkinovy choroby i non-Hodgkinova lymfomu, mnohočetného myelomu, různých sarkomů, ale i metastazujícího karcinomu prsu¹³⁰.

Vinblastin (Vinblastine Teva[®]) je v terapii používán velmi podobně jako vinkristin a to k léčbě Hodgkinovy choroby, non-Hodgkinova lymfomu, metastazujícího karcinomu prsu a pokročilého testikulárního karcinomu¹³¹.

Z polosyntetických derivátů těchto alkaloidů se v terapii používá např. vinorelbin (Navelbine[®]), vinflumin (Javlor[®]) a další¹²⁷.

Deriváty podofylotoxinu

Podofylotoxin je lignan izolovaný z kořenů a oddenků noholistu štítnatého (*Podophyllum peltatum*, Berberidaceae). Působí jako inhibitor topoisomerasy II, což vede k narušení replikace DNA nádorových buněk. V terapii se používají jeho deriváty etoposid a teniposid¹²⁷. Druhý zmíněný derivát ale v ČR není dostupný.

Etoposid (Etoposid Ebewe[®]) se používá zejména v terapii testikulárních tumorů; karcinomů vaječníků, žaludku a plic; akutní myeloblastické leukémie, Hodgkinovy choroby a non-Hodgkinova lymfomu¹³².

Deriváty kamptotecinu

Kamptotecin je alkaloid izolovaný z kůry kamtoteky ostrolisté (*Camptotheca acuminata*, Nyssaceae) a působí jako inhibitor topoisomerasy I. V terapii nádorových onemocnění se používají jeho deriváty topotekan a irinotekan¹²⁷.

Topotekan (Hycamtin[®]) se samostatně používá v terapii metastazujícího karcinomu vaječníků a relapsujícího malobuněčného karcinomu plic. V kombinaci s cisplatinou se používá v léčbě karcinomu děložního hrdla¹³³.

Irinotekan (Irinotecan Mylan[®]) se používá zejména v kombinaci s jinými cytostatiky v léčbě pokročilého či metastazujícího kolorektálního karcinomu¹³⁴.

3.2.2.2 Cytotoxická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů

Schopnost AmA inhibovat růst nádorových buněk *in vitro* je vedle inhibice lidských cholinesteras jednou z jejich nejrozšířeněji studovaných biologických aktivit. Některé AmA vykazují i aktivitu srovnatelnou s doxorubicinem, který je používán jako standard. Nejaktivnějšími a nejzkoumanějšími AmA z hlediska cytotoxicity a jejího mechanismu jsou lykorin, haemanthamin, narciklasin a pankratistatin¹³⁵⁻¹³⁸.

Lykorin

Tento hlavní zástupce AmA lykorinového strukturního typu (obr. 15A) se v řadě druhů čeledi Amaryllidaceae (např. *Narcissus* L., *Eucharis* Planch. & Lind.) vyskytuje v majoritním zastoupení, tudíž je snadno dostupný v gramových množstvích potřebných pro podrobné testy *in vitro* a *in vivo*, případně pro přípravu polosyntetických derivátů. *In vivo* na myších byl lykorin testován již v roce 1998 (melanom u BL6 myši)²² a posléze u bíglů, jimiž byl dobře snášen¹³⁹. Vzhledem k jeho aktivitě a dostupnosti slouží lykorin jako „lead structure“ pro přípravu různě obměněných polosyntetických derivátů¹⁴⁰. Podle přehledového článku Lamoral-Theys et. al z roku 2010¹⁴¹ bylo připraveno kolem 300 různých derivátů, z nichž 26 vykazovalo aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím.

Lykorin může proti nádorovým buňkám zasáhnout několika mechanismy a tento fakt je perspektivní z hlediska možného rozvoje rezistence. V první řadě lykorin působí jako silný induktor apoptózy¹⁴² a spouští apoptózu pomocí vnitřní (mitochondriální) i vnější (receptorové) kaskády. Lykorin dále zastavuje buněčný cyklus v G0/G1 či G2/M fázi – to podle typu nádorových buněk, což vede k zastavení dalšího buněčného dělení. Dalšími mechanismy účinku je programovaná nekróza s následnou smrtí nádorových buněk a inhibice autofagie, která fyziologicky slouží k odstraňování poškozených organel. Na druhou stranu u rozvinutých nádorů ale může nádorové buňky chránit před působením některých cytostatik. Posledním účinkem lykorinu vztahujícím se k jeho cytotoxickému působení je inhibice invaze a metastazování nádoru přes ovlivňování některých signalizačních drah¹⁴³.

Haemanthamin

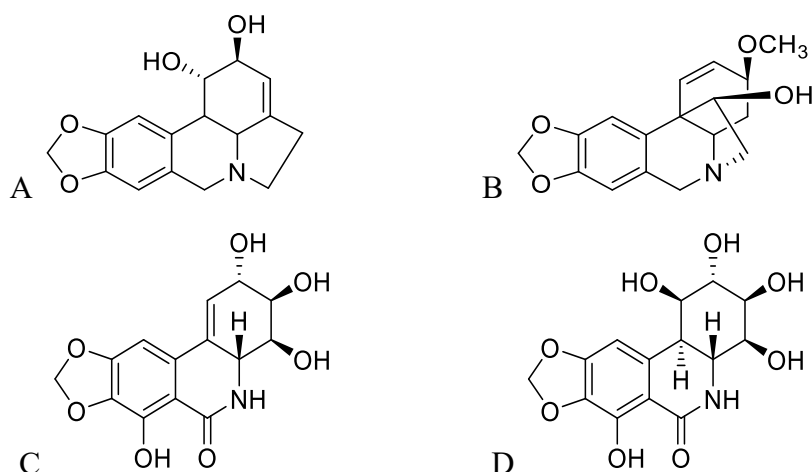
Haemanthamin (obr. 15B) je svou cytotoxickou aktivitou *in vitro* srovnatelný s lykorinem a jelikož je v některých rodech (*Narcissus* L.) přítomen v majoritním množství²⁰, rovněž slouží pro přípravu polosyntetických derivátů¹⁴⁴. Stejně jako lykorin, haemanthamin také působí jako induktor apoptózy a inhibitor buněčného cyklu v G0/G1 či G2/M fázi. Haemanthamin byl testován i *in vivo* na krysách, ale bohužel jeho eliminace z organismu je příliš rychlá^{145,146}.

Narciklasin

Tento alkaloid (obr. 15C) pankratistatinového typu vykazuje významnou cytotoxickou aktivitu (*in vitro* v řádu nM) a na rozdíl od lykorinu a haemanthaminu působí na nádorové buňky jiným mechanismem. Narciklasin blokuje mitózu a biosyntézu proteinů v buňce interakcí s 60S podjednotkou ribosomu. *In vivo* narciklasin prokázal dobrou aktivitu vůči nádorům mozku u myší, bohužel u jiných typů nádorů se jeho aktivita příliš nepotvrdila^{145,147}.

Pankratistatin

Pankratistatin (obr. 15D) je strukturně velmi blízký narciklasinu a jeho cytotoxická aktivita spočívá v indukci apoptózy aktivací kaspasy-3 a změnou propustnosti mitochondriální stěny. Bylo připraveno několik jeho polosyntetických derivátů, které kromě *in vitro* vykazují i zajímavou aktivitu *in vivo*^{145,148}.



Obr. 15 Struktura A - lykorinu, B - haemanthaminu, C - narciklasinu a D - pankratistatinu.

3.3 Malárie

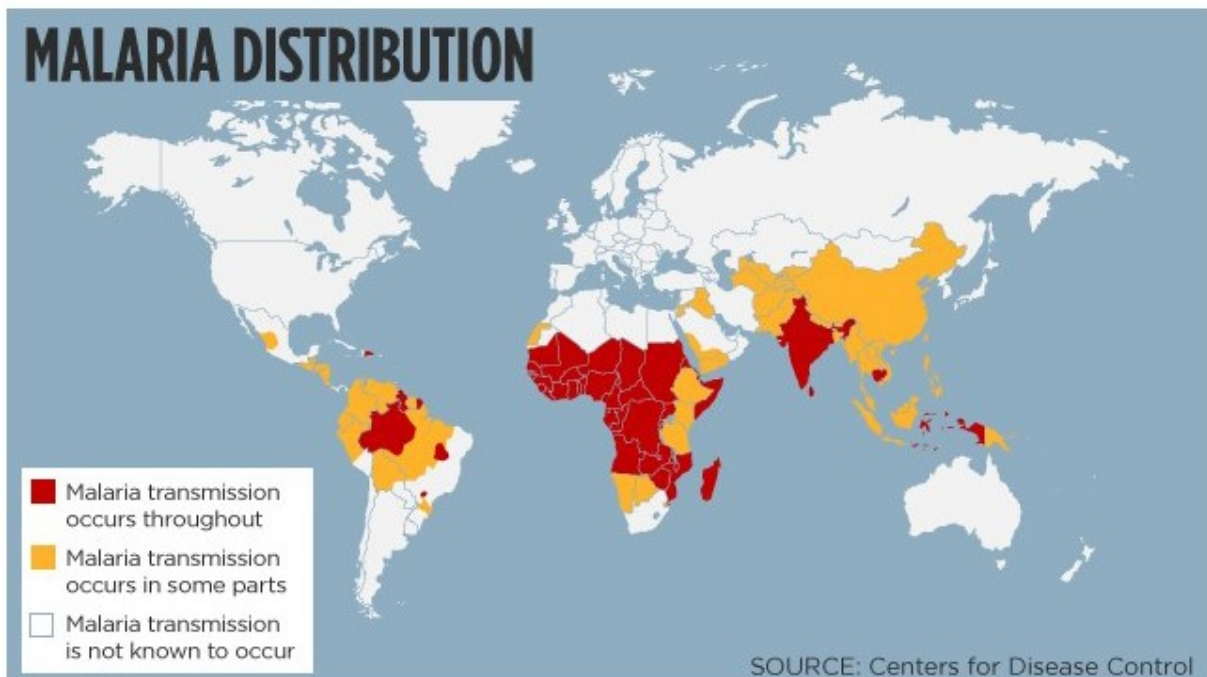
Malárie je parazitická protozoální infekce globálního významu. Dříve lidé měli za to, že je způsobena špatným vzduchem. Z těchto domněnek vznikl i název tohoto onemocnění – *mal aria*. Dnes již víme, že malárie je způsobena prvoky rodu *Plasmodium*. Tento rod zahrnuje 14 podrodů a přes 200 druhů. Z tohoto množství pouze čtyři druhy mají ve svém hostitelském cyklu primáty a mezi nimi i člověka. Ostatní druhy přenášejí malárii na nižší savce a zejména na ptáky a plazy¹⁴⁹. Mezi druhy plasmódií nebezpečných pro člověka patří *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*. Můžeme se setkat také s infekcí vyvolanou *P. knowlesi* – tento druh má jako hlavní hostitele zejména makaky, ale je možné se s tímto

typem malárie setkat i u člověka¹⁵⁰. Životní cyklus plasmódií kromě člověka zahrnuje ještě samičky komárů rodu *Anopheles sp.* (obr. 16), které jsou zodpovědné za přenos malárie. Člověk od člověka se může nakazit pouze prostřednictvím infuze nakažené krve nebo přenosem z matky na plod.

Sociální a ekonomický dopad malárie je enormní – zejména v zasažených endemických oblastech (obr. 17), v nichž žije přibližně 40 % světové populace¹⁵¹. Podle výročních zpráv WHO došlo mezi lety 2010 a 2017 ke snížení incidence malárie (po započítání růstu populace) o 19 % (z 239 na 219 milionů případů). Letalita ve stejném období klesla z 607 000 úmrtí (2010) na 435 000 úmrtí (2017). Prakticky polovina všech nakažených malárií se vyskytuje v pouhých pěti zemích – Nigérii, Demokratické republice Kongo, Indii, Mozambiku a Ugandě¹⁵².



Obr. 16 Komár rodu *Anopheles*¹⁵³.



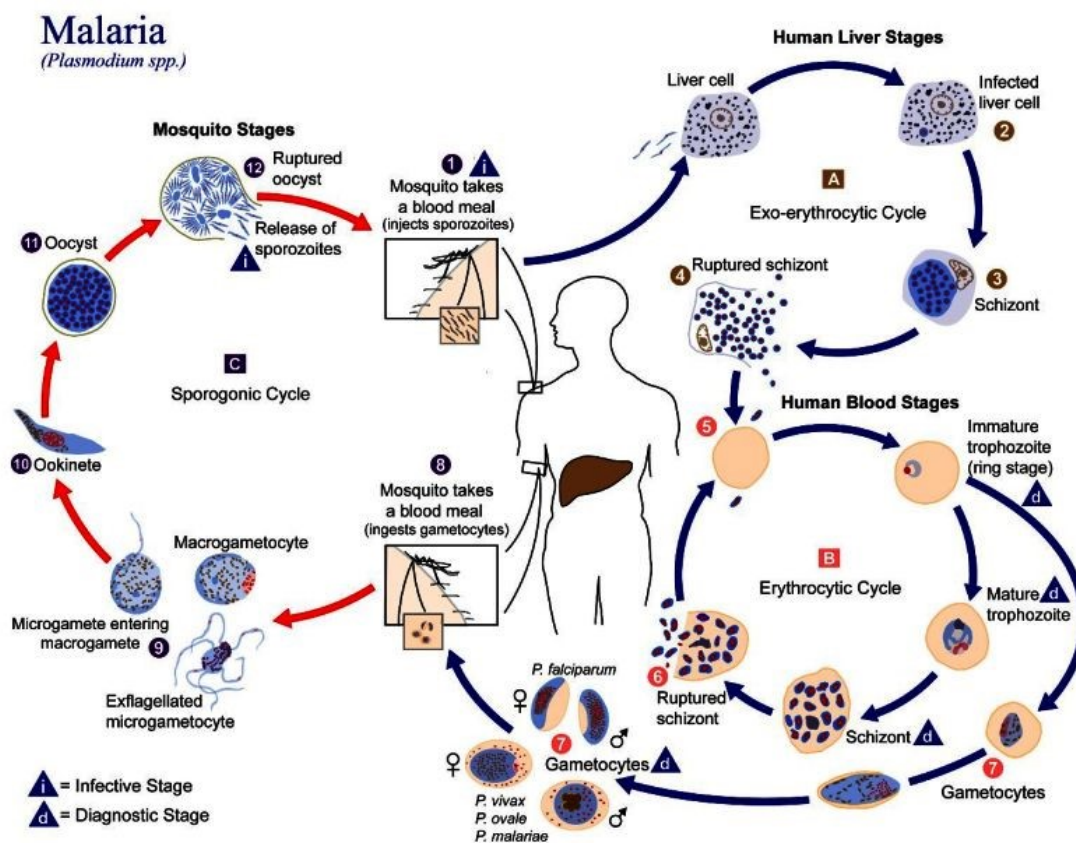
Obr. 17 Endemické oblasti ohrožené malárií¹⁵⁴.

Redukce incidence malárie a její letality je primárním cílem programu *Roll Back Malaria*¹⁵⁵, v němž se WHO spojila se Světovou bankou, rozvojovým programem OSN a UNICEF. Tento program si klade za cíl zlepšit dostupnost a efektivitu léčby, prevenci malárie u těhotných žen a malých dětí. Dalším cílem je snížení kontaktu lidí v ohrožených oblastech s komáry rodu *Anopheles* (sítě impregnované insekticidem okolo postele, používání účinných insekticidů, preventivní antimalarická chemoprophylaxe) a zajištění správných postupů v průběhu malarických epidemií¹⁵⁶.

3.3.1 Průběh malarické infekce

Jak již bylo zmíněno, člověk je pouze jedním z hostitelů v životním cyklu (obr. 18) protozoí *Plasmodium sp.* Druhým hostitelem jsou samičky komárů rodu *Anopheles*, v jejichž těle probíhá pohlavní rozmnožování plasmodií. Vzniklé sporozoity putují do slinných žláz komára, kde zrají a odkud se při sání dostanou do krve člověka. Sporozoity putují do jater, kde probíhá tzv. exoerytrocytární stadium. Sporozoity se replikují a vyžívají v jaterních buňkách ve schizonty, kteří posléze prasknou a uvolní merozoity. Ty se uvolní do krve a napadnou erythrocyty (nastává erytrocytární fáze cyklu), kde vznikají trofozoity. Z nich se následně v asexuální fázi stávají schizonty, které způsobí rozpad erythrocytů a uvolnění nových merozoitů do krevního oběhu. Část trofozoitů přechází do sexuálního stadia a vznikají gametocyty, které se při napadení komárem s pozřenou krví dostávají do jeho organismu, a celý cyklus začíná znovu. U druhů *P. vivax* a *P. ovale* existuje ještě stadium hypnozoitů, kteří se zapouzdří v játrech a mohou malárii vyvolat několik týdnů i let po nakažení. Proto je potřeba při malárii způsobené těmito dvěma druhy pamatovat i na léčbu, která působí na dormantní formy (primachin)¹⁵⁶.

Mezi hlavní příznaky malárie patří horečka vyšší než 38 °C každých 24 (*P. falciparum*), 48 (*P. vivax*, *P. ovale*) nebo 72 hodin (*P. malariae*). Vzhledem k dormantním stadiím *P. vivax* a *P. ovale* je potřeba u turistů navštěvujících endemické země, považovat za možnou malárii i horečku, která se objeví až dva měsíce po návratu. Dalším častým příznakem malárie je splenomegalie, případně hepatomegalie a žloutenka. U závažné formy malárie (definováno WHO)¹⁵⁶ se setkáváme s naprostým vyčerpáním organismu (pacient si bez pomoci není schopný ani sednout), poruchami vědomí, dýchacími obtížemi včetně plicního edému, selháváním krevního oběhu, nadměrným krvácením, hemoglobinurií nebo závažnou anémií. Tento stav může vést až k akutnímu selhání ledvin, intravaskulární hemolýze, koagulopatiím a šoku.



Obr. 18 Schéma životního cyklu *Plasmodium sp.*¹⁵⁷.

Nejzávažnější formou je mozková malárie, kterou provázejí poruchy vědomí, záchvaty a jejíž letalita je až 25 %. Pokud pacient přežije, většinou se potýká s přetrvávajícími neurologickými problémy¹⁵⁸. Do této fáze nejčastěji přechází malárie způsobená *P. falciparum* a nejrizikovější skupinou pro rozvoj závažné formy malárie jsou malé děti, těhotné ženy a lidé, kteří nemají proti malárii částečnou imunitu – tedy ti, kteří malárii nikdy neprodělali. U lidí, kteří malárii prodělali, se vyvíjí buněčná i humorální imunitní odpověď, která sice není 100% a nechrání před dalším nakažením, ale značně snižuje projevy infekce. Podle některých výzkumů je až 80 % pacientů, kteří malárii prodělali, při dalším nakažení i přes prokazatelnou parazitární asymptomatických^{159,160}. Z tohoto důvodu se na několika pracovištích pracuje na vývoji vakcíny proti malárii – např. RoPlaVac¹⁶¹.

3.3.2 Diagnostika

Nejrychlejším a nejspolehlivějším diagnostickým testem je mikroskopická analýza tlusté kapky nebo tenkého krevního roztěru (obr. 19) s barvením podle Giemsa-Romanovski, které umožňuje kvantifikaci parazitárního (procento napadených erytrocytů; počet plasmodií v mikrolitru krve) i určení druhu plasmodia. Pomocí těchto testů se kontrolují i pacienti

s pouhým podezřením na malárii, která nemůže být vyloučena, pokud pacient nemá minimálně tři negativní krevní roztěry během 48 hodin. Mikroskopická stanovení nejsou příliš náročná na vybavení, ale jsou náročná zejména na zkušené diagnostiky, kteří umí roztěry správně analyzovat a vyhodnotit¹⁵⁶.

Další často využívanou možností je rychlý test založený na detekci antigenu (rapid antigen detection test, RDT), který detekuje plasmodiální proteiny z krevní kapky po píchnutí do prstu. Provedení a vyhodnocení tohoto testu je tedy jednodušší než krevní roztěr, ale má zatím několik nedostatků. Současné RDT dokážou identifikovat pouze *P. falciparum* a *P. vivax* (nejčastější původci malárie), ale nejsou schopné infekci zcela kvantifikovat a jejich spolehlivost s nižší prazitemií klesá, tudíž nemohou samostatně sloužit k vyloučení malárie při diagnóze. Vzhledem k tomu, že v organismu nějaké množství antigenů přetrvává, nelze tyto testy použít ani k vyhodnocení úspěšnosti léčby^{150,162}.



Obr. 19 Krevní roztěr pacienta s malárií¹⁶³.

Poslední možností diagnostiky malárie je PCR, což je metoda velmi citlivá a téměř 100% spolehlivá, ale vzhledem k přístrojové náročnosti a zdlouhavosti není možné ji využívat pro rychlou diagnózu a zůstává využívána zejména ve výzkumu¹⁶⁴.

3.3.3 Problematika léčby a rozvoj rezistence

Volba vhodného antimalarika nebo jejich kombinace závisí zejména na druhu plasmodia, geografické oblasti a závažnosti infekce. Pokud se jedná o nekomplikovanou malárii, záleží zejména na původci. U chlorochin-senzitivního *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae* je léčivem první volby chlorochin (obr. 20A). U nekomplikované infekce *P. falciparum* nebo *P. knowlesi* jsou podávány kombinace založené na derivátech artemisininu (obr. 20B; artemisinine-based combination therapy, ACT). Používají se kombinace artemetheru s lumefantrinem,

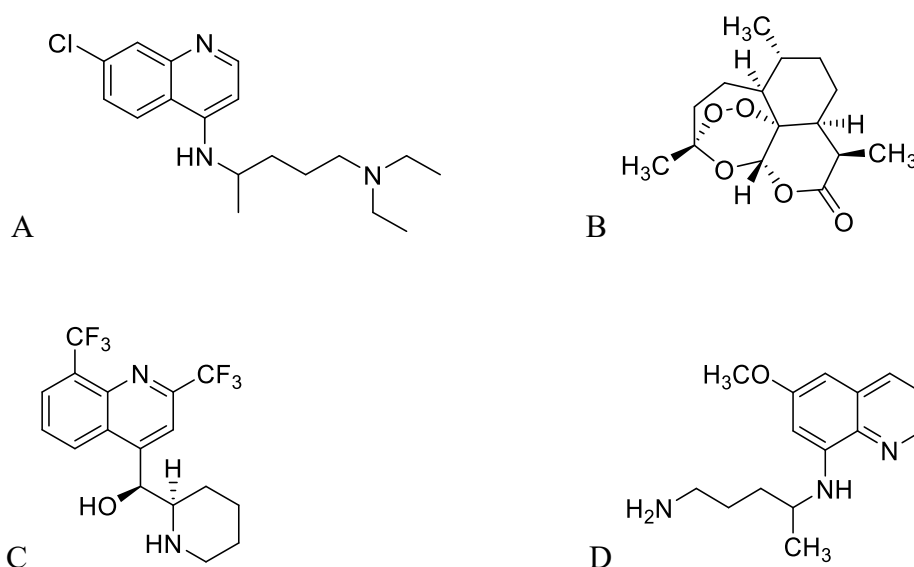
dihydroartemisininu s piperachinem, artesunatu s meflochinem nebo amodiachinem, atovachonu s proguanilem, případně artesunatu se sulfadoxinem a pyrimethaminem. U závažné malárie léčba začíná artesunatem intravenózně, dokud pacient není schopen sám jíst. Alternativou může být intravenózní infuze chininu nebo artemether intramuskulárně. V době, kdy je pacient schopen sám jíst a pít, se přechází na perorální ACT bez meflochinu (obr. 20C), který by potenciálně mohl zvýšit riziko rozvoje post-malarického neurologického syndromu. U infekce *P. vivax* a *P. ovale* je potřeba posléze nasadit primachin (obr. 20D), který je účinný proti hypnozoitům v játrech. U dětí, neimunních osob a těhotných žen se ke každému případu přistupuje jako k malárii způsobené chlorochin-rezistentnímu *P. falciparum*, dokud se neprokáže pravý původce^{150,156,161}.

Při léčbě malárie je potřeba použít správnou kombinaci antimalarik a dodržet jejich správné dávkování. Podávání subterapeutických dávek může vést k prodloužení léčby, ale i k jejímu selhání a přispívá k rozvoji rezistence. Historicky bylo pozorováno, že rezistence vznikají v oblasti kolem delty Mekongu v JV Asii, odkud se postupně šíří do ostatních endemických zemí malarického pásu. Chlorochin byl dlouhou dobu používán jako léčivo první volby, neboť je bezpečný a levný, a dodnes se v kombinaci používá k léčbě malárie způsobené nerezistentními kmeny¹⁶⁶. Na léčbu chlorochin-rezistentní malárie byly používány deriváty artemisininu, ale už byly objeveny i artemisinin-resistentní kmeny plasmodií^{167,168}. Z těchto důvodů se nyní používá zejména ACT, kdy jsou zkombinována 2 – 3 antimalarika s různými mechanismy účinku, aby byl další rozvoj rezistence pomalejší a méně pravděpodobný. Ale zejména léčba multirezistentních kmenů *P. falciparum* zůstává do dnešní doby velmi obtížná¹⁶⁹. Vedle antimalarik dochází i k rozvoji rezistence komárů vůči používaným insekticidům (pyrethroidy), tudíž i ty je nutno obměňovat a střídát s karbamáty, organofosfáty, atd.¹⁷⁰.

3.3.4 Antimalarická aktivita AmA

Jak již bylo popsáno dříve, AmA disponují širokou škálou biologických aktivit, mezi něž patří i aktivita antimalarická. Samotné alkaloidy vykazují spíše mírnou aktivitu²⁹ vůči jaternímu i krevnímu stadiu plasmodií, ale jako perspektivní se zdá příprava polosyntetických derivátů některých alkaloidů. Byla testována řada alkaloidů vůči chlorochin-senzitivním (K1, NF54) i chlorochin-rezistentním kmenům (T9.96) *P. falciparum* a v tabulce (tab. 2) jsou shrnuty ty s aktivitou <1μg/ml. Dále byly připraveny různé série derivátů lykorinu, lykoreninu a haemanthaminu, z nichž některé vykazovaly zajímavou aktivitu vůči chlorochin-senzitivnímu

kmenu *P. falciparum* F32 (tab. 3). V průběhu testování antimalarické aktivity alkaloidů a jejich derivátů je potřeba vzít v potaz jejich případnou toxicitu a v rámci testování se jí zabývat¹⁷¹.



Obr. 20 Struktury vybraných antimalarik A - chlorochin, B - artemisinin, C – meflochin, D - primachin.

Tab. 2 AmA, jejich deriváty a aktivita vůči vybraným kmenům *P. falciparum*.

Testovaná látka	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ [μg/ml]			
	K1	NF54	FCR3	T9.96
3-Epihydroxybulbispermin ¹⁷²	0,55	-	-	1,14
Haemanthamin ^{172,173}	0,43	0,67	-	0,70
6-Hydroxyhaemanthamin ¹⁷²	0,35	-	-	0,35
Haemanthidin ¹⁷³	-	0,70	-	-
Lykorin ¹⁷²	0,38	-	-	1,03
1- <i>O</i> -Acetyllykorin ¹⁷⁴	0,36	-	0,3	-
1,2-Di- <i>O</i> -butanoyllykorin ¹⁷⁴	0,67	-	0,53	-
1- <i>O</i> -(3'S)-Hydroxybutanoyllykorin ¹⁷⁴	0,60	-	0,45	-
1- <i>O</i> -(3'R)-Hydroxybutanoyllykorin ¹⁷⁴	0,62	-	0,49	-
1- <i>O</i> -Propanoyllykorin ¹⁷⁴	0,37	-	0,30	-
Pankracin ¹⁷⁵	0,75	0,70	-	-
Chlorochin ^{a,175}	0,057	0,004	-	6,06
Artemisinin ^{a,174,175}	0,003	0,004	0,006	-

^a standard

Tab. 3 Haemanthamin, lykorenin, lykorin, jejich deriváty a jejich antimalarická aktivita^{140,144,176}.

Testovaná látka	F32 <i>P. falciparum</i> IC₅₀ [μM]
Haemanthamin	1,3
Haemanthidin	1,2
11,12-Epoxyhaemanthamin	1,6
3,11-Dinicotyl-11-hydroxyvittatin	0,8
Dhippeastrinyl isoftalát	1,3
Dhippeastrinyl tereftalát	1,3
Lykorin	0,13
1,2-Diacetyllykorin	0,26
1,2-Bis(2-methylbutyryl)lykorin	0,6
1-Acetyllykorin	0,9
8,9-Diacetyl-5-methyl-4-vinyl-5,6-dihydrofenantridin	0,9
5-Butyl-8,9-diacetyl-4-vinyl-5,6-dihydrofenantridin	0,8
Chlorochin ^a	0,04

^a standard

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení pro izolaci a identifikaci alkaloidů

4.1.1 Chemikálie

- Vodný roztok amoniaku 22-25% p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (NH_3)
- Aceton p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (Me_2CO)
- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice) (MeCN)
- Benzin lékařský RN vyhovující ČL a ČSN 656544 (ing. Švec – Penta, Praha) (Bz)
- Cyklohexan č. (ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- Diethylamin p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)
- Diethylether p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- Dichlormethan p. a. (ing. Kroupa – Balex, Pardubice – Rosice nad Labem) (CH_2Cl_2)
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno) ($\text{BiNO}_3(\text{OH})_2 \cdot \text{BiO}(\text{OH})$)
- Ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- Ethylester kyseliny octové č. (ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- Hydroxid sodný č. (ing. Švec – Penta, Praha) (NaOH)
- Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) (HgCl_2)
- Chloroform č. (ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl_3)
- Chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl_3)
- Isopropylalkohol p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina vinná p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$)
- Methanol p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- Methanol deuterizovaný pro NMR analýzu – Methanol-d4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)
- Methanol HPLC (J. T. Baker, Denver, Netherlands) (MeOH)
- Toluén p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)

- Voda superčistá (H₂O)

Tab. 4 Vytvářecí soustavy použité pro preparativní a analytickou TLC.

Směs	Složení
S1	To ^a :EtOAc ^b :Et ₂ NH ^c 7:2:1
S2	To:EtOAc:Et ₂ NH 45:45:10
S3	To:EtOAc:Et ₂ NH 15:75:10
S4	EtOAc:Et ₂ NH 9:1
S5	EtOAc:MeOH ^d :Et ₂ NH 8:1:1
S6	EtOAc:MeOH:Et ₂ NH 5:4:1
S7	cHx ^e :Me ₂ CO ^f :NH ₃ ^g 50:50:1
S8	To:Et ₂ NH 9:1
S9	To:EtOAc:Et ₂ NH 8:1:1
S10	cHx:Et ₂ NH 9:1
S11	To:Et ₂ NH 95:5
S12	To:cHx:Et ₂ NH 50:50:5
S13	EtOAc:MeOH:H ₂ O 100:13:10
S14	To:EtOAc:Et ₂ NH 7:2,5:0,5
S15	cHx:IPA ⁱ :Et ₂ NH 77,5:15:7,5
S16	cHx:Me ₂ CO:NH ₃ 40:50:1
S17	cHx:EtOAc:IPA:Et ₂ NH 45:45:5:5
S18	cHx:Me ₂ CO:NH ₃ 10:80:1
S19	To:Me ₂ CO:EtOH ^j :NH ₃ 40:40:6:2
S20	CH ₃ CN:MeOH:TFA 40:10:0,1

^a toluen, ^b ethylacetát, ^c diethylamin, ^d methanol, ^e cyklohexan, ^f aceton, ^g amoniak, ^h voda, ⁱ isopropylalkohol, ^j ethanol

4.1.2 Adsorbenty pro chromatografii

- Oxid hlinitý (Al₂O₃) neutrální, pro chromatografii, 63 – 200 µm; Across (Lach-Ner, Neratovice) byl před použitím promyt směsí CHCl₃:EtOH (1:1) a vysušen při laboratorní. Poté byl aktivován při teplotě 200 °C po dobu 8 hodin. Zchladlý aktivní

Al_2O_3 byl následně deaktivován přidavkem 6 % vody a ekvilibrován v uzavřené nádobě po dobu 1 hodiny

- Komerční analytické TLC desky Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC (Merck Millipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm. Pro analytické účely byly použity desky o výšce 10 cm a variabilní šířce podle počtu analyzovaných vzorků a pro preparativní TLC byly použity desky o rozměru 10 × 20 cm.
- Lité vrstvy byly připraveny za použití Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha) a množství použitého SiO_2 bylo 29 mg/cm².

4.1.3 Činidla pro detekci alkaloidů

- **Dragendorffovo činidlo (podle Muniera):** zásobní roztok byl připraven smísením roztoku A (1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné rozpuštěné v 80 ml vody) a roztoku B (roztok 32 g KI v 80 ml vody) v objemovém poměru 1:1 a z tohoto roztoku byl připraven roztok detekční, jenž byl připraven smísením 5 ml zásobního roztoku a roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Zásobní i detekční roztok byly uchovávány v chladničce při teplotě 4°C.
- **Mayerovo činidlo:** roztok byl připraven rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a následným přidáním 1,35 g chloridu rtuťnatého v prášku. Vzniklá sraženina byla míchána do rozpuštění, dokud vzniklý roztok nebyl bezbarvý nebo světle žlutý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C.

4.1.4 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha), pro preparativní práci byla extrahována vodou a vysušena.
- Sušící perly silikagelu (ing. Švec – Penta, Praha)
- Síran sodný bezvodý p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2SO_4)

4.1.5 Přístroje

- Spektrometr EI/MS na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).
- Spektrometr ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Arcade, New York, USA).
- Spektrometr ESI/HRMS, Waters Synapt G2Si s hybridním analyzátozem quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) připojený na Waters Acquity I-Class UHPLC System (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA).
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA).
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany).
- Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany).
- Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland).
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany).

4.1.6 Databáze použité pro vyhodnocování výsledků

- Knihovna EI-MS spekter NIST Virtual Library 2011 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)

4.2 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení pro stanovení biologické aktivity alkaloidů

4.2.1 Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- AlamarBlue činidlo pro stanovení buněčné viability (Invitrogen, Kalifornie, USA)
- Berberin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Praha) (C₂₀H₁₈NO₄Cl)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH₂PO₄)

- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (DMSO)
- Dioxan p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)
- Fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, Německo) (FBS)
- Firefly Luciferase Assay Kit 2.0 (Biotium, Kalifornie, USA)
- Fungizon (roztok amfotericinu B 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma Aldrich, Německo)
- Galanthamin hydrobromid $> 98\%$ (Changsha Organic Herb Inc., People Republic of China) ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$)
- Gentamicin – roztok 50 mg/ml (Gibco, USA)
- Glukosa-6-fosfát (Sigma Aldrich, Německo) ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$)
- Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche, Německo)
- L-Glutamin (Invitrogen, Kalifornie, USA)
- HEPES pufr 1M roztok v H_2O (Sigma Aldrich, Německo)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (NaH_2PO_4)
- Huperzin A 98% (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., People Republic of China)
- Chlorid draselný p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (KCl)
- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- NADPH (Sigma Aldrich, Německo)
- Oracin (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Česká republika) ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$)
- Pen-Strep (lyofilizát 50000 UI/ml penicilinu a 50 mg/ml streptomycinu k rekonstituci) (Invitrogen, Kalifornie, USA)
- Rekombinantní AKR1C3 (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové)
- RPMI 1640 médium (Invitrogen, Kalifornie, USA)
- RPMI 1640 roztok neesenciálních aminokyselin (50 \times) (Invitrogen, Kalifornie, USA)
- Voda superčistá (H_2O)
- Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, Praha) ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$)
- Z-Pro-prolinal $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha) ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$)

4.2.2 Buněčné linie

- Huh-7 buněčná linie humánního hepatokarcinomu (Sigma Aldrich, Německo)

4.2.3 Pufry

- **5mM fosfátový pufr o pH 7,4** byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 10 mM roztokem NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH_2PO_4) a zásobní roztok B je 10 mM roztokem Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g Na_2HPO_4).
- **5mM fosfátový pufr o pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného** byl připraven z 8,766 g chloridu sodného p. a., jež byl rozpuštěn v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a poté jím doplněn do 1000 ml.
- **100mM fosfátový pufr o pH 7,4** byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200 mM roztokem NaH_2PO_4 (1 litru roztoku obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B je 200 mM roztokem Na_2HPO_4 (1 litru roztoku obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4).
- **PBS:** 100mM roztok Na/K fosfátového pufru o pH 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl. Zásobní roztok A byl připraven smísením 0,68 g KH_2PO_4 a 1,5 g NaCl a rozpuštěním ve 100 ml destilované vody. Zásobní roztok B byl připraven rozpuštěním 0,89 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,5 g NaCl ve 100 ml destilované vody. Výsledný pufr byl připraven smísením 20 ml roztoku a 100 ml roztoku B.

Hodnoty pH byly kontrolovány u všech pufrů na kalibrovaném pH metru PHM 220.

4.2.4 Přístroje použité ke stanovení biologické aktivity alkaloidů

- Centrifuga 5810/5810R (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Inkubátor IncuSafe CO₂ (PHC Europe, Etten-Leur, Nizozemsko)
- Laminární box Bio II Advance (Telstar, Terrassa, Španělsko)
- Microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Microplate multimodal reader Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)

- Mikrotitrační destičky 96 jamek (Fisher Scientific, Pardubice)
- Odstředivka AVANTI J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Kodaň, Denmark)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Statistický program GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA, 2006)
- Třepačka VWR standard analog shaker 1000 (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)

4.2.5 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči *hAChE* a *hBuChE*

- **Roztok 5mM DTNB:** roztok byl připraven přímým rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100 mM fosfátovém pufru pH 7,4, aby vznikl 5 mM roztok. Roztok je čirý nebo slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týden.
- **Roztok 10mM ATChI:** roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.
- **Roztok 10mM BuTChI:** roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

4.2.6 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP

- **Roztok 10mM Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu:** roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky v 40% 1,4-dioxanu, aby vznikl roztok o koncentraci 10 mM. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4°C.

4.3 Metody

4.3.1 Obecné postupy

Příprava rozpouštědel

Všechna komerční rozpouštědla (kromě rozpouštědel deklarovaných čistotou pro HPLC a NMR) byla před použitím standardně destilována a destilát byl jímán podle příslušných tabelárních teplot varu jednotlivých rozpouštědel.

Odpařování extraktů a frakcí

Pro odpaření spojených sumárních ethanolických extraktů pro izolaci alkaloidů byla použita poloprovodní vakuová odparka Laborota 20 Heidolph s teplotou vodní lázně 40 - 50 °C podle použitého rozpouštědla a tlakem 1,33 kPa.

Frakce získané během sloupcové chromatografie sumárního alkaloidního extraktu a posléze během dělení jednotlivých frakcí pomocí metod preparativní TLC byly odpařeny na vakuové odparce Buchi Rotavapor R-114 na vodní lázni s teplotou nastavenou v závislosti na složení použité eluční směsi.

Detekce alkaloidů v roztoku

Během vytřepávání alkaloidního extraktu z vodné fáze byla přítomnost alkaloidů ve vodné fázi prokazována pomocí Mayerova činidla.

Před začátkem vytřepávání byla provedena zkouška s malým množstvím (5 ml) slabě kyselého vodného roztoku alkaloidů, aby byla prokázána efektivita použití Mayerova činidla s analyzovanou směsí alkaloidů.

Roztok zkoumaného vzorku byl po odstranění organických rozpouštědel okyselen pomocí 2% HCl (pH 3) a tento roztok byl ve zkumavce smíchán s několika kapkami činidla. Obsahoval-li zkoumaný roztok alkaloidy, došlo ke vzniku výrazné bělavé sraženiny¹⁷⁷.

Sušení extraktů a frakcí, izolovaných látek a jejich skladování

Alkaloidní extrakt, jeho frakce i izolované chemicky čisté látky byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru (vakuum přibližně 1,33 kPa) nad sušícími perlami silikagelu po dobu minimálně 24 hodin. Po vysušení byly uzavřené baňky skladovány v chladničce při teplotě 2-8 °C.

Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven nalitím suspenze Al₂O₃ ve směsi rozpouštědel, která byla použita pro zahájení eluce (viz Tab. 5). Sumární alkaloidní extrakt určený k dělení byl nanesen na sloupec v podobě roztěru s adsorbentem v poměru 1:4 (w/w). Tento roztěr byl

přípraven rozpuštěním extraktu v malém množství CH_2Cl_2 , jeho adsorbováním na Al_2O_3 a následným mícháním na vodní lázni do odpaření rozpouštědla. Vzniklý roztěr byl posléze vysušen v exsikátoru po dobu 24 hodin. Samotná chromatografie probíhala formou stupňovité eluce. Alkaloidy jednotlivých najímaných frakcí byly detekovány pomocí analytické TLC a postříku Dragendorffovým činidlem.

Vakuová sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven navrstvením silikagelu do kolony a dělený extrakt byl na sloupec nanesen ve formě roztěru, jehož příprava je shodná s přípravou viz výše, pouze byl jako sorbent použit silikagel. Chromatografie probíhala za tlaku 1,99 kPa. Chromatografie probíhala formou stupňovité eluce viz tab. 9 a detekce alkaloidů probíhala stejně, jak je popsáno výše.

Příprava litých desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

Preparativní TLC desky s litou vrstvou byly připravovány nalitím suspenze připravené rozmícháním 6,5 g komerčního silikagelu Silikagel 60 GF254 v 20,5 ml destilované vody na skleněné desky o rozměru 15 x 15 cm ($29 \text{ mg SiO}_2/\text{cm}^2$). Před použitím byly takto připravené desky sušeny za pokojové teploty po dobu alespoň 24 hodin.

Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Směs alkaloidů určená k dělení byla rozpuštěna ve směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) nebo $\text{EtOAc}:\text{MetOH}$ (1:1) a nanesená na chromatografickou desku pomocí chromatografického pera na linii startu 1 cm od okrajů a 1,5 cm od spodní hrany desky. Množství desek pro preparativní TLC bylo vypočítáno tak, aby množství dělené směsi nepřesahovalo 3 mg/cm u litých vrstev nebo 1 mg/cm u komerčních desek Merck. Desky byly ponechány volně na vzduchu do odpaření rozpouštědel z nanesené dělené směsi a poté byly vyvíjeny v chromatografických komorách, které se před použitím sytily zvolenou vyvíjecí směsí rozpouštědel (tab. 4) po dobu 25 min. Desky byly po vyvinutí a vyjmutí z komory sušeny volně v digestoři, po vysušení analyzovány za využití UV detekce ($\lambda = 254$ a $\lambda = 366 \text{ nm}$). Po UV detekci mohly být desky vyvíjeny znovu za použití stejné nebo odlišné mobilní fáze, nebo po detekci části jedné z desek Dragendorffovým byly separované zóny označeny preparativní jehlou a izolovány mechanickou separací z jednotlivých zón z chromatografické desky. Zóny se shodným R_f ze všech vyvíjených desek byly spojeny. Spojený separovaný adsorbent z jednotlivých zón byl smíchan s křemelinou Celite 535 a eluován v chromatografické trubici 15násobným množstvím směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) nebo $\text{EtOAc}:\text{MetOH}$ (1:1) podle toho, která ze směsí byla použita pro rozpuštění separované frakce.

Detekce alkaloidů po analytické tenkovrstvé chromatografii

Chromatogramy po všech TLC (frakce ze sloupcové chromatografie, kontrola čistoty izolovaných látek nebo hledání vhodných vyvíjecích směsí pro separaci) byly vždy nejprve detekovány vizuálně pomocí UV světla za použití dvou různých vlnových délek ($\lambda = 254$ nm a $\lambda = 366$ nm) a všechny viditelné zóny byly označeny tužkou. Chromatogramy s takto označenými zónami byly následně detekovány postřikem Dragendorffovým činidlem. Činidlo bylo použito k postřiku suchých desek a v přítomnosti alkaloidů se na chromatografické desce objevily intenzivně oranžové skvrny.

4.3.2 Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů

GC/MS analýza

Analýza složení jednotlivých frakcí a posléze i izolovaných alkaloidů byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 pracujícího s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Separace byla prováděna na koloně HP-5. Byl použit následující teplotní program: 100 °C – 180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180 – 300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium, jehož průtoková rychlost byla 0,8 ml/min. Nástřík vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1 μ l methanického roztoku analyzovaného vzorku (koncentrace 1 mg/ml) při splitu 1:10. Alkaloidy byly identifikovány porovnáváním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), daty publikovanými v literatuře a se standardy látek, které byly v naší laboratoři již izolovány.

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

MS (ESI) spektra byla měřena pro látky neionizující pomocí elektronové ionizace. Spektra byla získána pomocí spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizací elektrosprejem v kladném módu a analyzátozem byla iontová past. MS byla prováděna při kolizní energii 40 eV. Alkaloidní roztok v MeOH ($c = 1$ mg/ml) byl zaváděn přímo na sondu.

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS-Q-TOF MS (ESI))

Tato metoda hmotnostní spektrometrie byla využívána v případě izolace nových látek, které nebyly dosud v literatuře popsány. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru s vysokým hmotnostním rozlišením Waters Synapt G2Si s ionizací elektrosprejem v kladném módu a kombinovaným analyzátozem – kvadrupól s analyzátozem doby letu (TOF). Vzorky byly měřeny v roztoku MeCN a bylo porovnáváno teoretické m/z s m/z experimentálně zjištěným.

Nukleární magnetická rezonance

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S500 pracujícím při 499,87 MHz pro jádra ^1H a 125,70 pro jádra ^{13}C . K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty (OneNMR). Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl_3 jsou u atomů ^1H $\delta = 7,26$ ppm a u atomů ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Měřením získaná data jsou uváděna v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita spekter ^1H NMR, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

Dvoudimenzionální (2D) NMR experimenty (gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY) byly měřeny standardními sekvencemi dodanými firmou Varian. Parametry měření byly stanoveny podle množství vzorku, jeho čistoty a molekulové hmotnosti.

gCOSY (gradient correlation spectroscopy): crosspeak se objevuje mezi protony, které mají přímé spojení proton-proton přes tři vazby, $3J_{\text{HH}}$.

gHSQC (gradient heteronuclear single quantum coherence): jedna osa představuje ^1H a druhá ^{13}C . Tato spektra představují korelace mezi H a C přes jednu vazbu.

gHMBC (gradient heteronuclear multiple bond coherence): technika, jež pomáhá určit korelace C s H přes 3 vazby (případně i 2 nebo 4 vazby).

NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy): crosspeak se objevuje mezi protony od sebe vzdálenými do 6 Å a jeho intenzita klesá se zvyšující se vzdáleností protonů v prostoru.

Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost alkaloidů byla měřena v jejich methanolových nebo chloroformových roztocích na polarimetru P3000 a specifická otáčivost jednotlivých látek byla vypočítána podle vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times a}{c \times l}$$

t – teplota měření [°C]; D – sodíková čára $\lambda = 589,3$ nm; α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace měřeného alkaloidu [g/100 ml]; l – délka kyvety [dm].

4.4 Studium biologické aktivity izolovaných alkaloidů

4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterasám

Příprava hemolyzátu a plazmy

Zdrojem acetylcholinesterasy (*hAChE*) byl hemolyzát lidských erytrocytů a zdrojem butyrylcholinesterasy (*hBuChE*) lidská plazma.

Erytrocyty byly získány z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru je krev rozdělena stejnoměrně po 5 ml do kónických šroubovacích zkumavek a provede se centrifugace při rychlosti 4000 rpm při 4 °C po dobu 10 minut. Po první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nebyly žádné erytrocyty, a je uchovávána do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin).

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu je opatrně odsát bezpopelným filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička je sestřižena. Poté je odečten objem erytrocytární masy a sediment se zředí takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby výsledný objem erytrocytární suspenze byl 13 ml. Suspenze je rovnoměrně promísena a poté je provedena centrifugace způsobem, který je uveden výše při oddělování plazmy. Promytí erytrocytů je tímto způsobem provedeno celkem 3× a promývací kapalina je dokonale odstraněna. Po trojím promytí je přidáno takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu NaCl, aby byl objemový poměr erytrocyty:pufr 1:5. Tato směs je homogenizována, přelita do Erlenmeyerovy baňky a erytrocyty jsou ponechány spontánní hemolýze za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Jakmile je hemolýza ukončena, je u suspenze stanovena acetylcholinesterasová aktivita, případně se přidáním 5mM fosfátového pufru upravena absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08 – 0,15) a naředěný hemolyzát je po rozplnění do Eppendorfků uchováván do doby použití při -22 °C.

Butyrylcholinesterasová aktivita plazmy je stanovena stejným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15 – 0,20) a plazma je po rozplnění uchovávána stejným způsobem jako hemolyzát.

Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)¹⁷⁸ [$\lambda = 436$ nm (AChE), nebo $\lambda = 412$ nm (BuChE)]. Během stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 min. Hodnoty IC₅₀ jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regrese

v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras - galanthaminem a Huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}} \right)$$

$\% I$ – procento inhibice; ΔA_{Bl} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min; ΔA_{Sa} – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitrační destičky je napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO, vše je po dobu 1 min promícháváno na mikrotřepačce a poté je směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci je přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM ATChI nebo 10 mM BuTChI) a při příslušné vlnové délce (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm) je proměřena absorbance. Způsobem popsaným výše je vypočten rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: do mikrotitrační destičky jsou použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), shodný je též postup měření. Pro měření inhibiční aktivity látky jsou použity koncentrace: 40; 10; 4; 1 a 0,4 mM, případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady je pipetován DMSO jako slepý vzorek.

Získané inhibiční aktivity IC_{50} *hAChE* a IC_{50} *hBuChE* pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem ($IC_{50, hAChE} = 1,710 \pm 0,065 \mu$ M, $IC_{50, hBuChE} = 42,301 \pm 0,065 \mu$ M), Huperzinem A ($IC_{50, hAChE} = 0,033 \pm 0,001 \mu$ M, $IC_{50, hBuChE} > 1000 \mu$ M) a berberinem ($IC_{50, hAChE} = 0,705 \pm 0,104 \mu$ M, $IC_{50, hBuChE} = 30,721 \pm 3,492 \mu$ M).

4.4.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidase

POP byla rozpuštěna v pufovaném fyziologickém roztoku PBS, specifická aktivita enzymu byla 0,2 U/ml. Stanovení inhibiční aktivity bylo provedeno v polystyrenové mikrotitrační destičce s plochým průhledným dnem. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a tím byly připraveny jejich zásobní roztoky ($c = 10$ mM). Roztoky pro testování ($10^{-3} - 10^{-7}$ M) byly připraveny ředěním zásobních roztoků superčistou vodou, slepé vzorky byly připraveny přidáním DMSO ve stejné koncentraci, jako v testovaných vzorcích. Jako substrát pro testování

inhibiční aktivity byl použit *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilid rozpuštěný v 40% 1,4-dioxanu ($c = 10 \text{ mM}$). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 170 μl PBS, 5 μl roztoku testované látky o určité koncentraci a 5 μl roztoku POP. Tato směs byla následně inkubována po dobu 5 min při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do každé jamky přidáno 20 μl substrátu a směs byla dále inkubována po dobu 30 min při teplotě 37 °C. V destičce byl sledován a spektrofotometricky měřen vznik *p*-nitroanilinu, jehož množství je přímo úměrné aktivitě POP, ($\lambda = 405 \text{ nm}$; microplate ELISA reader EL800). Inhibiční aktivita testovaných látek je vyjádřena jako IC_{50} . Získané inhibiční aktivity testovaných látek byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek berberinu ($\text{IC}_{50} = 142,3 \pm 21,1 \text{ mM}$) a *Z*-Pro-prolinalu ($\text{IC}_{50} = 3,269 \pm 0,021 \text{ mM}$).

4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β

Stanovení inhibiční aktivity AmA proběhlo ve spolupráci s dr. Vincenzou Andrisano a dr. Angelou De Simone z Department for Life Quality Studies University of Bologna během Erasmus+ stáže Mgr. Daniely Hulcové, Ph.D. Stanovení bylo provedeno pomocí Kinase-Glo Kit (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Španělsko), humánní rekombinantní GSK-3 β a GSM substrát napodobující svalovou glykogen synthasu (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) luminiscenční metodou podle Bakiho et al. Stanovení bylo provedeno v bílých 96-jamkových destičkách s plochým dnem. V každé jamce bylo 10 μl roztoku testované látky v DMSO o výsledné koncentraci 1 mM naředěného pufrům (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA a 15 mM octanu hořečnatého) na požadovanou koncentraci. K tomuto roztoku bylo přidáno 10 μl ATP (výsledná koncentrace 1 μM), 10 μl 100 μM GSM a 10 μl GSK-3 β (20 ng). Negativní kontrola byla vytvořena přidáním dalších 10 μl pufru a kdo pozitivní kontroly bylo přidáno 10 μl standardu SB-415286. Celková koncentrace DMSO ve výsledné směsi nepřesáhla 5 %. Reakční směs byla 30 min inkubována při teplotě 37 °C, poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 40 μl Kinase-Glo činidla a po dalších 10 min byla měřena luminiscence (dlouhodobý typ luminiscence). Hodnoty IC_{50} byly spočítány a vyhodnoceny pomocí programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Podrobnější popis postupu tohoto stanovení je možno najít v následující publikaci: Hulcová et al. (2018)¹⁷⁹.

4.4.4 Stanovení inhibiční aktivity proti jaternímu stadiu malárie *in vitro*

Stanovení inhibiční aktivity vůči jaternímu stadiu *Plasmodium berghei in vitro* bylo provedeno v rámci Erasmus+ stáže v MPrudêncio Lab, Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, Lisabon. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a byly připraveny jejich zásobní roztoky o koncentraci 10 mM, které byly uchovávány při teplotě – 20 °C a z nichž byly v čas potřeby připraveny vzorky pro testování. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem byly nasazeny buňky linie Huh-7 (buněčná linie humánního hepatokarcinomu) v koncentraci 10 000 buněk/100 µl média/jamka a byly inkubovány po dobu 24 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Pro kultivaci i nasazení buněk bylo použito cRPMI médium [RPMI 1640, 10% v/v fetálního bovinního séra (FBS), 1% v/v směsi penicilin/streptomycin (pen-strep), 1% v/v roztoku glutaminu, 1% v/v roztoku neesenciálních aminokyselin a 10 mM HEPES, pH 7).

Pro screening byly zásobní roztoky smíseny s médiem, jež bylo připraveno z cRPMI (viz výše) obohacemím o gentamicin (1:1000) a fungizon (1:300). Ze zásobních 10 mM roztoků byly naředěny roztoky o koncentraci 10; 5 a 1 µM. Jako kontrola byl použit roztok DMSO v médiu o koncentraci 10 µM. Z destičky s nasazenými buňkami bylo po 24 hodinách inkubace odstraněno médium a místo něj byly v triplicátech pipetovány roztoky testovaných látek a kontrola. Z izolovaných slinných žláz samiček komára druhu *Anopheles stephensi* byly získány sporozoity prvoka *Plasmodium berghei* (původce myší malárie)¹⁸⁰ upravené tak, aby produkovaly luciferasu (PbA-LuciGFPcon). Suspenze získaných sporozoitů byla naředěny médiem a v co nejnižším objemu, aby nedošlo ke změně koncentrace testovaných látek, přidána do destičky hodinu po přidání látek. Koncentrace sporozoitů a buněk v jamce byla v poměru 1:1 – tj. 10000/jamka. Poté byla destička centrifugována 5 min při 1800 × g a inkubována 46 hodin při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.

Po 46 hodinách inkubace bylo z destičky odstraněno médium s testovanými látkami a místo něj bylo pipetováno 80 µl roztoku činidla pro stanovení buněčné viability na základě redukční aktivity živých buněk alamarBlue v cRPMI médiu smísených v poměru 1:20. Destička byla dále inkubována ve stejných podmínkách po dobu 90 min a po uplynutí této doby byla na readeru Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) změřena fluorescence (excitace: 530 nm/ emise: 590 nm), z jejichž hodnot byla vypočítána viabilita buněk v procentech.

Pro další stanovení bylo z destičky odstraněno médium s alamarBlue činidlem, buňky byly opláchnuty PBS (100 µl/jamka) a poté k nim bylo přidáno 50 µl lyzačního pufru (Firefly Luciferase Lysis Buffer) a destička byla po dobu 15 min na třepače při 600 rpm. Posléze byla destička centrifugována 5 min při 1800 × g, aby buněčné zbytky klesly na dna jamek. Z každé

jamky bylo pipetováno 20 μ l supernatantu do bílé destičky s 96 jamkami s plochým dnem. Roztok luciferinu byl zředěn FLAB (Firefly Luciferase Analysis Buffer, Firefly Luciferase Assay Kit 2.0) v poměru 1:50 a těsně před měřením byl pipetován k supernatantu (30 μ l/jamka). Okamžitě po napipetování roztoku luciferinu byla 3 \times po sobě měřena luminiscence, z níž byla vyhodnocena míra inhibice růstu sporozoitů *P. berghei*.

Pokud byla látka po třech nezávislých screeningových stanoveních vyhodnocena jako potenciálně účinná, byla stejným způsobem třikrát nezávisle testována její IC₅₀, kdy byly měřeny vždy triplikáty sedmi koncentrací. Tyto koncentrace se lišily podle výsledku screeningu.

Podrobnější popis experimentu a práce s komáry *Anopheles stephensi* viz publikace Ploemen et al.¹⁸⁰.

4.4.5 Stanovení cytotoxické aktivity *in vitro*

Všechny studie týkající se cytotoxicity izolovaných látek byly provedeny ve spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze a Ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě v Hradci Králové. Podrobný soupis studií a vysvětlení postupů je možno nalézt v následujících publikacích Doskočil et al. (2015)¹³⁸ Havelek et al. (2014)^{135,181}.

Ve spolupráci s LF HK bylo provedeno stanovení buněčné viability/cytotoxického působení testovaných látek pomocí kolorimetrické metody WST-1. Tato metoda je variací na metodu MTT, ale používá 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát místo roztoku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu, který je používán při MTT testu. Obě tato činidla jsou tetrazoliové soli, ale u WST-1 odpadá krok rozpouštění¹⁸² a stanovení je rychlejší a citlivější¹⁸³.

Z testovaných látek byly v závislosti na jejich rozpustnosti připraveny zásobní roztoky o koncentraci 10 – 50 mM a dále byly ředěny v čas potřeby tak, aby koncentrace DMSO byla <0,1%, aby byl vyloučen jeho toxický efekt. Buňky byly nasazeny do 96-jamkové destičky s plochým dnem v koncentraci 1000 buněk/jamka. Po 24 hodinách inkubace při 37 °C a 5% koncentraci CO₂ byly k buňkám přidány testované látky v koncentraci 10 μ M, popřípadě doxorubicin o koncentraci 1 μ M jako pozitivní kontrola²⁹. Po 48 hodinách inkubace ve stejných podmínkách bylo do jamek přidáno WST-1 činidlo, jež bylo redukováno mitochondriálními dehydrogenasami v živých buňkách na purpurový formazan^{183,185}, který byl rozpuštěn přidáním DMSO, a absorbance byla měřena na readeru Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)

při vlnové délce $\lambda = 440$ nm. Míra zabarvení roztoku je přímo úměrná množství živých buněk. Aktivita každé látky byla vypočítána ze tří nezávislých experimentů a byla spočítána buněčná viabilita v porovnání s negativní kontrolou, kdy k buňkám nebyla přidána žádná účinná látka, ale pouze 0,1 % DMSO, což je odpovídající jeho koncentraci v ostatních jamkách. Ke stanovení IC_{50} u aktivních látek byla data zpracována pomocí programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA).

4.4.6 Stanovení inhibiční aktivity vůči AKR1C3

Inhibiční aktivita vůči enzymu AKR1C3 byla měřena ve spolupráci s Katedrou biochemických věd FaF UK (prof. Ing. V. Wsól, Ph.D. a doc. RNDr. L. Zemanová, Ph.D.). Nejprve byla stanovena redukční aktivita rekombinantní AKR1C3 inkubací s oracinem za přítomnosti NADPH-generujícího systému. Standardní inkubace byly provedeny v mikrozkuvkách Eppendorff a směs se skládala vždy z 10 μ l AKR1C3 (odpovídá 1,76 μ g v inkubační směsi), 40 μ l NADPH-generujícího systému, 20 μ M testované látky a 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4. Jelikož byly inhibitory rozpuštěny v MeOH, bylo do kontrolních inkubačních směsí přidáno 5 % MeOH, aby bylo vyloučeno případné ovlivnění inhibiční aktivity alkaloidů MeOH. Reakce byly nastartovány přidáním 20 μ l roztoku oracinu (výsledná koncentrace = 0,5 mM). Celkový objem inkubačních směsí byl 200 μ l. Inkubace probíhala po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Složení používaného NADPH-generujícího systému bylo následující: 0,8 mM NADP⁺, 6 mM glukosa-6-fosfátu, 35 UI glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3 mM MgCl₂ v 0,1 mM fosfátovém pufru, pH 7,4. Po uplynutí doby inkubace byly reakce zastaveny přidáním 80 μ l 26% NH₄OH a inkubační směs byla ochlazena na ledové tříšti na 0 °C. Metabolit 11-dihydrooracin (DHO) byl extrahován do 600 μ l EtOAc při intenzivním míchání na třepače po dobu 10 s. Vzorky byly centrifugovány 2 min v mikrocentrifuze. Organické fáze byly pak přeneseny do nových mikrozkuvek a extrakty byly odpařeny při sníženém tlaku a teplotě. Získané odparky byly rozpuštěny v 250 μ l mobilní fáze a připraveny pro HPLC analýzu. Každý vzorek byl testován ve čtyřech nezávislých experimentech.

První sada inhibičních experimentů byla provedena pro vybrané alkaloidy, jež byly k dispozici v dostatečném množství tak, aby jejich výsledná koncentrace v inkubační směsi byla 20 μ M. Všechny látky byly rozpuštěny v MeOH na zásobní roztoky o koncentraci 1 mM, ty byly pak zředěny směsí MeOH:H₂O 1:1 (v/v) na roztoky o koncentraci 0,2 mM. Pro zjištění míry inhibice jednotlivých látek byly provedeny inkubace a zastavení tak, že do inkubačních

směsí bylo přidáno 20 μ l 0,2 mM roztoků jednotlivých alkaloidů a tím byla získána jejich výsledná koncentrace 20 μ M v inkubační směsi.

4.5 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule *Narcissus* cv. Professor Einstein byly dodány firmou Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace rostlinného materiálu byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc a dokladný vzorek byl uložen v herbáriu Katedry farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod označením *Narcissus* cv. Professor Einstein CUFPH-16130/AL-447. Cibule byly vysazeny o kolekce rostlin pro udržování pěstování na Zhradě léčivých rostlin FaF UK v HK.

4.6 Izolace alkaloidů

34,3 kg čerstvých cibulí *Narcissus* cv. Professor Einstein bylo pokrájeno a posléze rozemleto v mlýnku. Rozdrobněný rostlinný materiál byl 2 \times extrahován dvojnásobným množstvím 95% EtOH za varu pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Spojené extrakty byly zfiltrvány a odpařeny za vzniku hnědého sirupovitého odparku. Rezidua EtOH byla odpařena jako azeotropická směs s destilovanou vodou. 638 g sumárního odparku bylo postupně rozpuštěno v 1,5 l 5% HCl, naředěno destilovanou vodou na 4,5 l roztoku o pH \sim 1 a zfiltrváno přes vliselin a posléze přes vrstvu křemeliny Celite 535. Filtrační vrstva byla promyta destilovanou vodou. Kyselý vodný roztok byl odtučněn vytřepáním s 2 \times 4l Et₂O a byl dále zpracován. Vodný roztok byl alkalizován 10% vodným roztokem Na₂CO₃ na pH 9-10 a vytřepán 4 \times 4l CHCl₃ za průběžné kontroly Mayerovým činidlem. Organická fáze byla odpařena a bylo získáno 51,5 g sumárního alkaloidního extraktu konzistence hnědého sirupu. Tento primární alkaloidní extrakt byl dále přečištěn vytřepáváním. Odparek byl rozpuštěn v 1 l 2% HCl a výsledný roztok zfiltrván přes vrstvu křemeliny Celite 535, jež byla následně promyta 0,5 l destilované vody. Vodná fáze byla odtučněna 2 \times 0,5 l Et₂O, alkalizována na pH 9-10 a vytřepána 5 \times 0,5 l Et₂O a 8 \times 0,5 l CHCl₃. Kvantitativní extrakce alkaloidů byla průběžně kontrolována pomocí Mayerova činidla. Etherový i chloroformový výtřepok byly vysušeny pomocí bezvodého Na₂SO₄ a na základě kontrolního TLC spojeny dohromady za zisku 31,7 g přečištěného alkaloidního extraktu, jenž byl dále zpracován pomocí sloupcové chromatografie na neutrálním Al₂O₃ desaktivovaným 6 % destilované vody (tab. 5).

Tab. 5 Průběh sloupcové chromatografie.

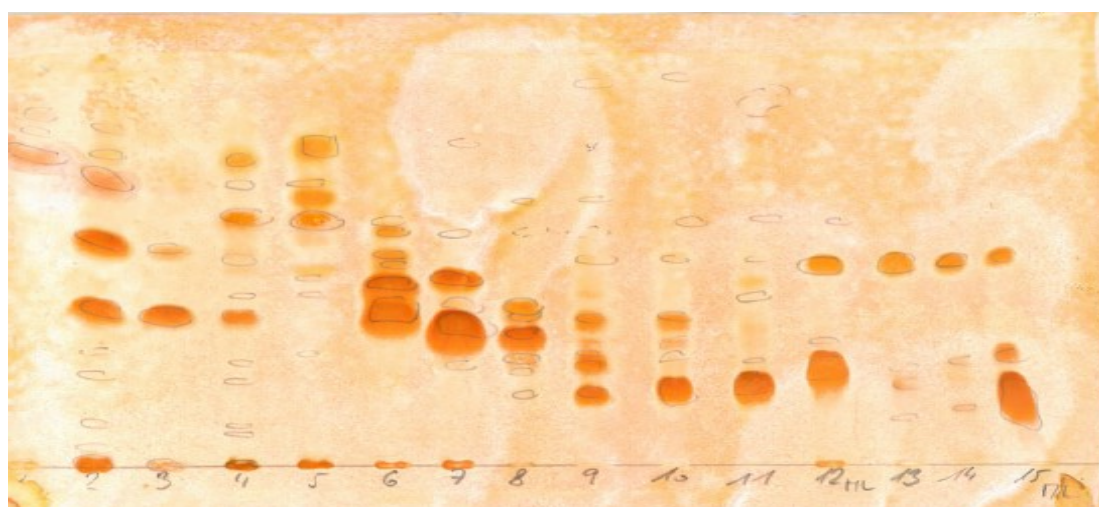
Označení	Spojené frakce	Eluční směs	Množství	Popis
	1 - 110	Bz : CHCl ₃ (70 : 30) Bz : CHCl ₃ (65 : 35) Bz : CHCl ₃ (60 : 40) Bz : CHCl ₃ (55 : 45) Bz : CHCl ₃ (50 : 50)		bez alkaloidního obsahu
1	111-145	Bz : CHCl ₃ (45 : 55) Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	0,010 g	viskózní, hnědý
2	146 – 150	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	0,020 g	viskózní, hnědý
3	151 – 158	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	0,030 g	viskózní, hnědý
4	159 – 173	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	0,070 g	viskózní, hnědý
5	174 – 177	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	0,050 g	viskózní, hnědý
6	178 – 187	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	1,59 g	viskózní, hnědý
7	188 – 191	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	1,69 g	viskózní, hnědý
8	192 – 195	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	0,300 g	viskózní, hnědý
9	196 – 199	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	0,080 g	viskózní, hnědý
10	200 – 215	Bz : CHCl ₃ (35 : 65) Bz : CHCl ₃ (30 : 70)	0,270 g	viskózní, hnědý
11	216 – 221	Bz : CHCl ₃ (30 : 70)	0,170 g	viskózní, hnědý
12	222 – 297	Bz : CHCl ₃ (30 : 70) Bz : CHCl ₃ (25 : 75) Bz : CHCl ₃ (20 : 80)	3,16 g	krystalizující, světle hnědý
13	298 – 324	Bz : CHCl ₃ (20 : 80) CHCl ₃ (100) CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	0,310 g	viskózní, hnědý
14	325 – 329	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	0,183 g	viskózní, hnědý
15	330 – 332	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	0,828 g	krystalizující, nažloutlý
16	333 – 336	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	0,616 g	krystalizující, nažloutlý
17	337 – 357	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	1,206 g	viskózní, hnědý
18	358 – 373	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	1,426 g	viskózní, světle hnědý
19	374 – 381	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	1,388 g	krystalizující, světle hnědý
20	382 – 386	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	1,134 g	krystalizující, světle hnědý
21	387 – 397	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	0,585 g	krystalizující, světle hnědý
22	398 – 402	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2) CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	0,127 g	viskózní, hnědý
23	403 – 408	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	0,182 g	viskózní, hnědý
24	409 – 429	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5) CHCl ₃ : EtOH (90 : 10)	0,936 g	viskózní, hnědý
25	430 – 466	CHCl ₃ : EtOH (90 : 10) CHCl ₃ : EtOH (80 : 20)	6,543 g	viskózní, hnědý
26	467 – 478	CHCl ₃ : EtOH (80 : 20) CHCl ₃ : EtOH (50 : 50)	0,672 g	viskózní, hnědý
27	479 – 493	CHCl ₃ : EtOH (50 : 50) EtOH (100)	0,941 g	viskózní, hnědý
Celkem			24,517 g	

Tab. 6 Parametry sloupcové chromatografie.

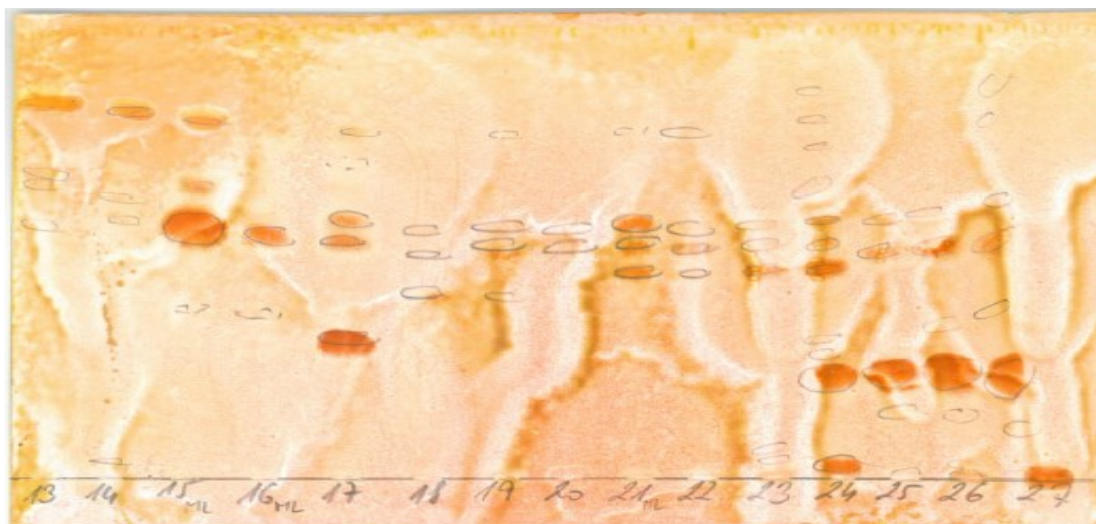
Hmotnost odparku	31,6 g
Adsorbent na roztěr	124 g
Adsorbent	2000 g
Dělicí vrstva sloupce	76 cm
Vrstva alkaloidní frakce	5 cm
Průměr sloupce	5,8 cm
Objem frakce	250 ml

Tab. 7 Mobilní fáze použité pro kontrolní TLC v průběhu sloupcové chromatografie.

Mobilní fáze	Frakce
S1	132 - 204
S2	205 - 272
S3	273 - 372
S4	373 - 376
S5	377 - 416
S6	417 - 493



Obr. 21 TLC spojených frakcí 1 – 15, S1.



Obr. 22 TLC spojených frakcí 13 – 27, S5.

4.6.1 Izolace látek ze spojených alkaloidních frakcí

Frakce 1 – 3 (60 mg) byly vzhledem k jejich malým množstvím spojeny a pomocí TLC na komerčních deskách rozděleny na 3 podfrakce. Z podfrakce **1-3/2** bylo po dalším dělení (S7; 1× a S8; 1×) získáno 5 mg látky **NPE-1**, jež byla pomocí GC-MS, ESI-MS a standardu identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu. Z podfrakce **1-3/3** byla získána látka **NPE-2** (6 mg), která byla také identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu.

Z **frakce 5** (50 mg) byly po separaci (S9; 1×) získány 4 podfrakce a z podfrakce označené **5/3** byla získána látka **NPE-3** (S9; 1× a S10; 2×). Tato látka byla pomocí NMR identifikována jako alkaloid pankratistatinového strukturního typu.

Frakce 7 (1,69 g) byla zpracována na litých TLC deskách (S11; 3×) za zisku 4 podfrakcí. Podfrakce **7/2** byla dále separována (S12; 3×) a bylo z ní získáno 7 mg látky **NPE-4**, jež byla identifikována jako alkaloid lykorinového typu. Podfrakce **7/3** také podstoupila další dělení (S11; 5×) a z podfrakce **7/3-1** byla ze směsi CHCl_3 :EtOH (1:1) krystalizovány látka **NPE-5** (20 mg), jež byla pomocí GC-MS a standardu určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu. Z podfrakce **7/3-2** byly dále separovány látky **NPE-6** (15 mg) a **NPE-7** (30 mg) (S13; 2×), které byly obě pomocí NMR identifikovány jako alkaloidy galanthaminového strukturního typu. Z podfrakce **7/4** (S14; 2×) byla po přečištění získána látka určená pomocí GC-MS a NMR analýzy jako alkaloid lykorinového strukturního typu **NPE-8** (15 mg).

Frakce 8 (300 mg) byla podrobena separaci pomocí TLC (S15; 2×) a byla rozdělena na 4 podfrakce. Z podfrakce **8/2** byly po následném dělení (S16; 1×) získány látky **NPE-9** (5 mg),

NPE-10 (6 mg), jež byly určeny jako alkaloidy lykorinového typu a **NPE-11** (81 mg), která byla určena jako alkaloid typu galanthaminového. Dále bylo z podfrakce **8/3** po přečištění pomocí TLC (S17; 2×) získáno 10 mg látky **NPE-12**, která byla pomocí NMR a optické otáčivosti určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu.

Frakce 11 (138 mg) byla rozdělena na 5 podfrakcí (S14; 2×). Podfrakce **11/5** byla přečištěna přes Silpearl a dále rozdělena na 2 podfrakce (S17; 2×). Z podfrakce **11/5-2** byla z EtOH krystalizována látka **NPE-13** (35 mg) ve formě oranžových jehlicovitých krystalů, která byla dále určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu.

Z **frakce 12** (3,16 g) bylo ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1) získáno krystalizací 100 mg látky **NPE-14**, jež byla určena jako látka haemanthaminového strukturního typu.

Ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1) bylo z **frakce 16** (616mg) krystalizováno 166 mg látky **NPE-15**. Tato látka byla pomocí GC-MS, ESI-MS a NMR určena jako látka homolykorinového typu. Matečný louh byl dále chromatograficky zpracován (S3; 2×) na 4 podfrakce a z podfrakce **16/4** bylo z horkého EtOH rekrystalizováno 127 mg látky **NPE-16**, jejíž struktura byla pomocí GC-MS a NMR určena jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu. Z **frakce 18** (1,43 g) bylo krystalizací z horkého EtOH získáno 752 mg látky **NPE-17**.

Frakce 19 – 21 byly spojeny dohromady (3,11 g) a byla z nich ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1) krystalizována látka **NPE-18** (1,85 g). Matečný louh byl podroben chromatografické separaci (S7; 3×) a byl rozdělen na 6 podfrakcí. Z podfrakce **19-21/1** byla krystalizací získána látka **NPE-19** (20 mg), jež byla přečištěna rekrystalizací z horkého EtOH a pomocí GC-MS a NMR určena jako alkaloid tazettinového strukturního typu. Podfrakce **19-21/3** byla dále dělena (S8; 1× a následně S7; 1×) za zisku látky **NPE-20**. Tato látka byla pomocí ESI-MS a NMR identifikována jako alkaloid homolykorinového typu.

Frakce 25 (6,54 g) byla nejprve podrobena VLC (Tab. 8 a Tab. 9) za tlaku 1,99 kPa na sloupci silikagelu (Kieselgel-mesh 0,15/0,30) deaktivovaného 6 % destilované vody s použitím směsi EtOAc a MeOH v různých poměrech. Bylo získáno 7 podfrakcí, jež byly dále děleny pomocí preparativní TLC. Podfrakce **25/6** byla rozdělena (S18; 3×) na 5 podfrakcí a z podfrakce **25/6-1** bylo získáno 62 mg látky lykorinového strukturního typu **NPE-21**, která byla rekrystalizována z EtOH. Z podfrakce **25/6-2** byla izolována látka **NPE-22**, jež byla identifikována jako alkaloid haemanthaminového typu. Z podfrakce **25/6-4** bylo po dalším dělení (S19; 2×) získána a rekrystalizována látka, která byla pomocí NMR, optické otáčivosti a X-ray identifikována jako látka montaninového strukturního typu **NPE-23** (132 mg) a z podfrakce **26/6-5** bylo po přečištění přes Silpearl získáno 1425 mg látky **NPE-24**, jež byla pomocí NMR a ESI-MS identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu.

Frakce 26 (672 mg) byla zpracována pomocí TLC (S5, 1×) na 4 podfrakce. Podfrakce **26/3** byla dále rozdělena za použití preparativní TLC (S7; 2×) na 3 podfrakce. Podfrakce označená jako **26/3-3** byla dále chromatografována (S7; 2×) za zisku 6 podfrakcí, z nichž byla dále čištěna podfrakce **26/3-3-6** (S19; 40:40:6:2, 1×) a po dalším zpracování bylo z podfrakce **26/3-3-6/2** (S20; 40:10:0,1; 1× a S5, 2×) získáno 20 mg látky **NPE-25**.

Tab. 8 Parametry vakuové sloupcové chromatografie frakce 25.

Hmotnost dělené frakce	6,5 g
Adsorbent na roztěr	23,6 g
Adsorbent	200 g
Dělicí vrstva sloupce	18,5 cm
Vrstva alkaloidní frakce	1,8 cm
Průměr sloupce	5,2 cm
Objem frakce	150 ml

Tab. 9 Průběh vakuové sloupcové chromatografie frakce 25.

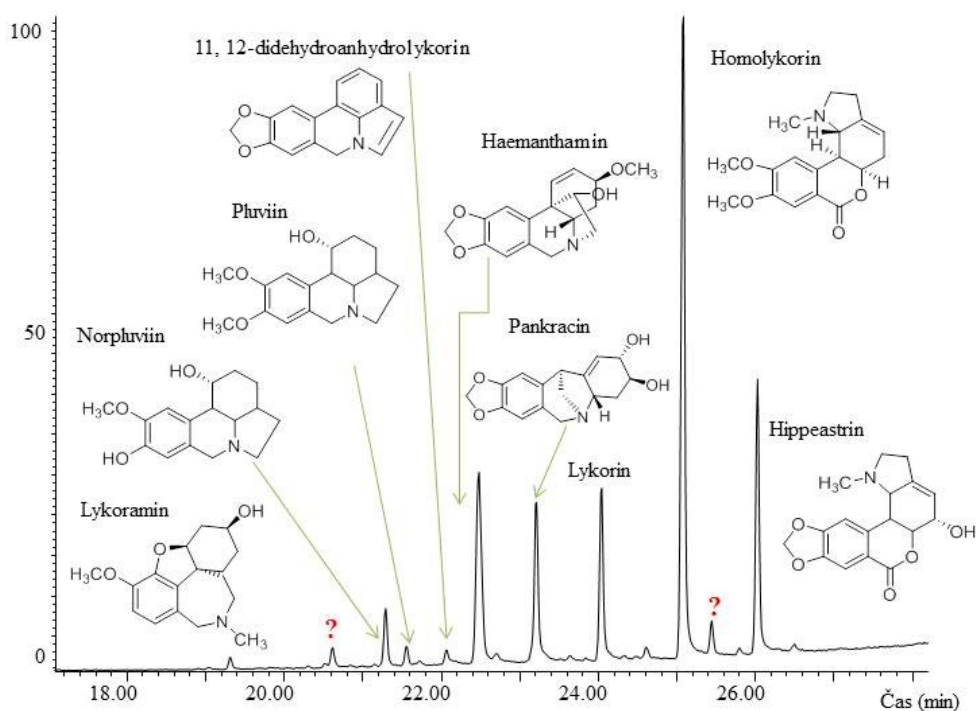
Označení	Spojené frakce	Eluční směs	Množství	Popis
	1 - 3	EtOAc : MeOH (8 : 2)		bez alkaloidního obsahu
1	4 - 6	EtOAc : MeOH (8 : 2)	0,095 g	viskózní, žlutohnědý
2	7	EtOAc : MeOH (8 : 2)	0,032 g	viskózní, žlutohnědý
3	8 - 11	EtOAc : MeOH (8 : 2)	1,368 g	viskózní, žlutohnědý
4	12 - 16	EtOAc : MeOH (8 : 2)	1,926 g	viskózní, hnědý
5	17 - 26	EtOAc : MeOH (8 : 2)	0,819 g	viskózní, žlutohnědý
6	27 - 44	EtOAc : MeOH (8 : 2) EtOAc : MeOH (1 : 1)	2,311 g	viskózní, hnědý
7	45 - 49	MeOH (100)	0,122 g	viskózní, hnědý

5 VÝSLEDKY

5.1 GC-MS analýza sumárního alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí

Narcissus cv. Professor Einstein

V rozsáhlém screeningu, jenž byl součástí několika diplomových prací na katedře farmaceutické botaniky a jehož dílčí výsledky byly shrnuty v publikaci Breiterová et al. (2018)¹⁸⁶, byl pro další fytochemickou studii na základě GC-MS analýzy, stanovení inhibice cholinesteras a obsahu predikovaných alkaloidů vybrán *Narcissus* cv. Professor Einstein. Pomocí GC-MS sumárního alkaloidního extraktu bylo určeno 12 alkaloidů náležejících do pěti strukturních typů - galanthaminového (1), lykorinového (3, 4, 5, 8, 9), haemanthaminového (6), krininového (7) a homolykorinového (10, 12). Dvě látky (A₁, A₂) se podle GC-MS analýzy určit nepodařilo - viz obr. 23 a tab. 10. V tab. 11 je možno nalézt přehled všech izolovaných látek.

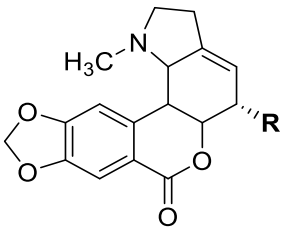
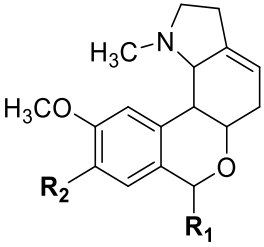
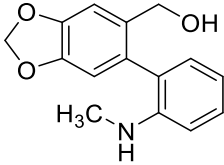
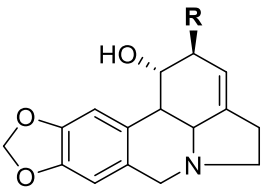
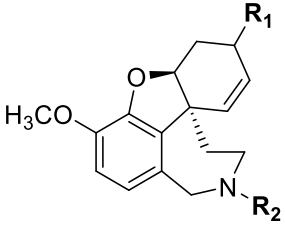
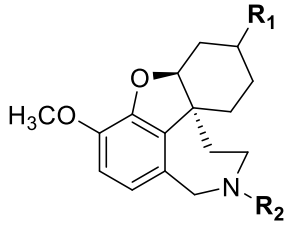
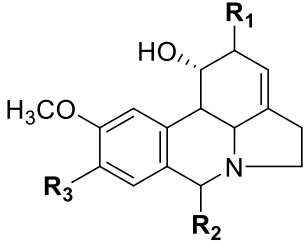
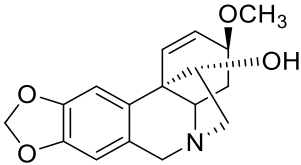
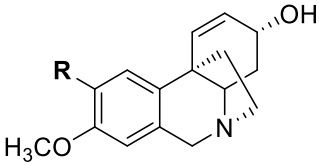
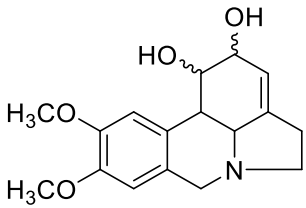
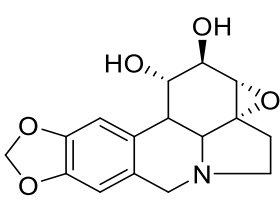
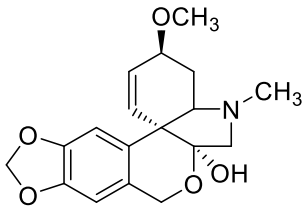
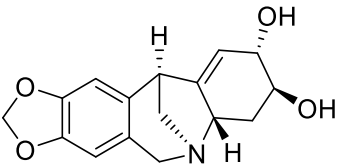


Obr. 23 GC-MS analýza sumárního alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí *Narcissus* cv. Professor Einstein.

Tab. 10 Alkaloidy identifikované v sumárním alkaloidním extraktu *Narcissus* cv. Professor Einstein pomocí GC-MS a popis jejich hmotnostních spekter.

Sloučenina	RT ^a (min)	[M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzity)	%	Reference pro MS
1. Lykoramin	19,314	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	tr	NIST 11
2. A ₁ – homolykorinový typ	20,625	?177(7), 109(100)	1	
3. Norpluviin	21,299	273(75), 273(33), 254(42), 242(6), 229(50), 228(100), 241(5)	3	NIST 11
4. Pluviin	21,569	287(81), 286(48), 268(52), 254(15), 243(66), 242(100), 228(23)	1	NIST 11
5. 11, 12– Didehydroanhydrolykorin	22,076	249(59), 248(100), 190(25), 163(7), 95(15)	1	187
6. Haemanthamin	22,486	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	16	NIST 11
7. Pankracin	23,216	287(100), 286(20), 270(17), 243(17), 223(15), 214(16), 199(18), 185(26)	11	NIST 11
8. Lykorin	24,046	287(30), 268(24), 250(32), 227(68), 226(100), 211(5), 147(9)	10	NIST 11
9. 9- <i>O</i> -Methylpseudolykorin	24,604	303(35), 284(24), 243(86), 242(100)	<1	NIST 11
10. Homolykorin	25,086	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	39	188
11. A ₂	25,450	329(31), 269(76), 268(100), 250(93), 240(16), 226(81), 211(12), 147(15)	2	
12. Hippeastrin	26,033	315(-), 162(4), 134(4), 125(100), 96(36), 82(3)	15	187

Tab. 11 Přehled izolovaných látek.

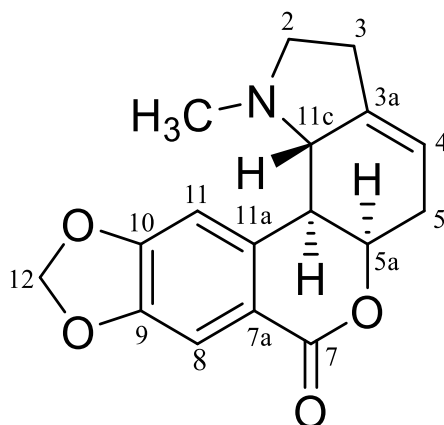
		
<p>R=H Masonin (1) R=OH Hippeastrin (15)</p>	<p>R₁=O R₂=OCH₃ Homolykorin (2) R₁=OC₂H₅ R₂=OH Eugenin (20) R₁=O R₂=OH 9-O-Demethylhomolykorin (24)</p>	<p>Ismin (3)</p>
		
<p>R=H Karanin (4) R=OH Lykorin (18)</p>	<p>R₁=OH R₂=CH₃ Galanthamin (5) R₁=O R₂=CH₃ Narwedin (6) R₁=OH R₂=H Epinorgalanthamin (12)</p>	<p>R₁=O R₂=CH₃ Lykoraminon (7) R₁=OH R₂=H Norlykoramin (13) R₁=OH R₂=CH₃ Lykoramin (11)</p>
		
<p>R₁=R₂=H R₃=OCH₃ Pluviin (8) R₁=R₂=H R₃=OH Norpluviin (21) R₁=H R₂=O R₃=OH 7-Oxonorpluviin (25) R₁=R₃=OCH₃ R₂=H Galanthin (10)</p>	<p>Haemanthamin (14)</p>	<p>R=OCH₃ Epimaritidin (16) R=OH 9-O-Demethylmaritidin (22)</p>
		
<p>9-O-Methylpseudolykorin isomer (17)</p>	<p>Inkartin (9)</p>	<p>Tazettin (19)</p>
	<p>Pankracin (23)</p>	

5.2 Alkaloidy izolované z *Narcissus* cv. Professor Einstein a jejich strukturní analýza

5.2.1 NPE-1: Masonin

Látka byla identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu masonin¹⁸⁹.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 299,326

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 299 (M⁺, 1), 190 (1), 162 (5), 134 (1), 109 (100), 108 (20), 94 (3).

MS (ESI): m/z (%) = 300 (M+1, 100), 266 (5), 211 (3).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

7.49 (1H, s, H-8), 6.96 (1H, s, H-11), 6.07 (2H, dd, J = 4.7, 0.9 Hz, OCH₂O), 5.50 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-4), 4.75 (1H, m, H-5a), 3.18 (1H, ddd, J = 7.4, 6.3, 4.2 Hz, H-2), 2.72-2.76 (2H, m, H-11c), 2.58-2.62 (2H, m, H-5), 2.48-2.52 (2H, m, H-3), 2.27 (1H, dd, J = 18.7, 9.2 Hz, H-2), 2,06 (3H, s, NCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

165.4 (C-7), 151.8 (C-9), 147.8 (C-10), 140.2 (C-3a), 139.7 (C-11a), 118.5 (C-7a), 115.6 (C-4), 109.7 (C-11), 102.0 (OCH₂O), 77.3 (C-5a), 66.8 (C-11c), 56.3 (C-2), 43.8 (C-11b), 43.5 (NCH₃), 31.1 (C-5), 27.9 (C-3).

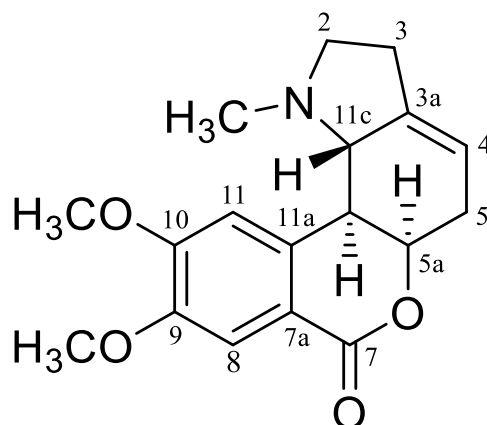
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 98^\circ$ ($c = 0,15$; CHCl_3)

5.2.2 NPE-2: Homolykorin

Látka byla identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu homolykorin¹⁹⁰.

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4$



Molekulová hmotnost

$M_r = 315,369$

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 206 (<1), 178 (1), 150 (1), 109 (100), 108 (20), 94 (3), 82 (3).

MS (ESI): m/z (%) = 316 (M+1, 100), 298 (5), 241 (5).

NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

7.56 (1H, s, H-8), 6.96 (1H, s, H-11), 5.50 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-3), 4.80 (1H, t, H-5a), 3.95 (3H, s, OCH_3), 3.94 (3H, s, OCH_3), 2.71 (1H, m, H-11c), 2.63 (3H, m, H-2, H-11b), 2.50 (2H, m, H-3), 3.12 (1H, ddd, $J = 9.8, 3.3, 7.2$ Hz, H-2), 2.39 (2H, m, H-5), 2.23 (1H, q, $J = 9.8$ Hz, H-2), 2.00 (3H, s, NCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

165.9 (C-7), 153.1 (C-10), 148.9 (C-9), 140.9 (C-3a), 137.8 (C-11a), 116.9 (C-7a), 115.2 (C-4), 111.9 (C-8), 110.8 (C-11), 77.7 (C-5a), 66.6 (C-11c), 56.6 (C2), 56.4 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 44.2 (NCH_3), 43.8 (C-11b), 31.3 (C-5), 28.1 (C-3).

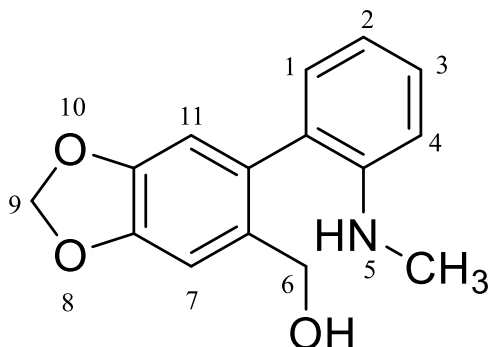
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 80^\circ$ ($c = 0,02$; CHCl_3)

5.2.3 NPE-3: Ismin

Látka byla identifikována jako alkaloidpankratistatinového strukturního typu ismin¹⁹¹.

Sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$



Molekulová hmotnost

$M_r = 257,289$

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 257 (M^+ , 22), 239 (25), 238 (100), 196 (6), 180 (8), 139 (6).

NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

7.28 (1H, ddd, $J = 8, 7, 2$ Hz, H-3), 7.00 (1H, s, H-10), 6.98 (1H, s, H-1), 6.81 (1H, ddd, $J = 7, 7, 1$ Hz, H-2), 6.73 (1H, dd, $J = 8, 1$ Hz, H-4), 6.67 (1H, s, H-7), 5.99 (2H, s, OCH_2O), 4.26 (1H, d, $J = 12$ Hz, H-6), 4.20 (1H, d, $J = 12$ Hz, H-6), 2.73 (3H, s, NCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

147.5 (C-8), 147.4 (C-9), 146.7 (C-4a), 134.0 (C-6a), 131.2 (C-10a), 129.9 (C-1), 129.1 (C-3), 127.2 (C-10b), 118.0 (C-2), 110.7 (C-4), 110.2 (C-10), 109.7 (C-7), 101.3 (OCH_2O), 63.5 (C-6), 30.8 (NCH_3).

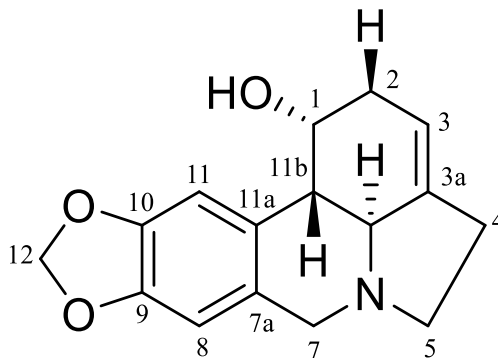
Optická otáčivost

Tato látka nemá chirální centrum, tudíž nestáčí rovinu polarizovaného světla.

5.2.4 NPE-4: Karanin

Látka byla určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu karanin^{192,193}.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 271,316

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 271 (M⁺, 85), 270 (48), 252 (52), 250 (10), 240 (10), 227 (50), 226 (100), 215 (5).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.82 (1H, s, H-11), 6.58 (1H, s, H-8), 5.90 (1H, d, J = 16.1 Hz, overlapped, OCH₂O), 5.90 (d, J = 16.1 Hz, OCH₂O), 5.45-5.41 (1H, m, H-3), 4.76-4.70 (1H, m, H-1), 4.13 (1H, d, J = 14.0 Hz, H-7) 3.52 (1H, d, J = 14.0 Hz, H-7), 3.35- 3.31 (1H, m, H-5), 2.78 (1H, d, J = 10.7, 2.6 Hz, H-13), 2.61-2.59 (2H, m, H-2), 2.59-2.50 (2H, m, H-4), 2.41 (1H, dd, J = 10.7, 2.6 Hz, H-12), 2.35-2.31 (1H, m, H-5).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.6, 146.3, 139.0, 130.5, 127.8, 114.5, 107.8, 104.6, 101.0, 64.9, 60.9, 57.2, 53.9, 45.1, 35.3, 28.6.

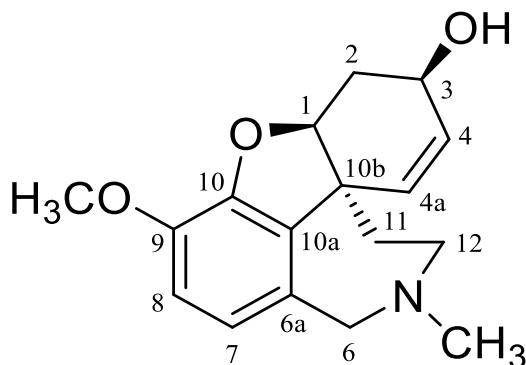
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{30} = -203^\circ$ (c = 0,9; CHCl₃)

5.2.5 NPE-5: Galanthamin

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu galanthamin¹⁹⁴.

Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 287,359

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M⁺, 80), 286 (100), 270 (15), 256 (2), 244 (28), 230 (16), 216 (40), 174 (37), 128 (9), 115 (15).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.65 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-8), 6.60 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 6.05 (1H, dd, J = 10.4, 1.6 Hz, H-4a), 5.98 (1H, ddd, J = 10.4, 5.0, 1.3 Hz, H-4), 4.59 (1H, m, H-1), 4.12 (1H, m, H-3), 4.07 (1H, d, J = 15 Hz, H-6), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.66 (1H, dd, J = 15, 1.2 Hz, H-6), 3.25 (1H, ddd, J = 14.4, 12.8, 1.9 Hz, H-12), 3.03 (1H, ddd, J = 14.4, 4.0, 3.2 Hz, H-12), 2.6 – 2.8 (1H, m, H-2), 2.39 (3H, s, NCH₃), 2.07 (1H, ddd, J = 13.7, 12.8, 3.2 Hz, H-11), 1.99 (1H, ddd, J = 15.7, 5.0, 2.5 Hz, H-2), 1.56 (1H, ddd, J = 13.7, 4.0, 1.9 Hz, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

145.7 (C-10), 143.8 (C-9), 132.8 (C-10a), 129.2 (C-6a), 127.3 (C-4), 126.6 (C-4a), 121.7 (C-7), 111.1 (C-8), 88.4 (C-1), 61.7 (C-3), 60.3 (C-6), 55.7 (OCH₃), 53.6 (C-12), 47.9 (C-10b), 41.9 (NCH₃), 33.6 (C-11), 29.8 (C-2).

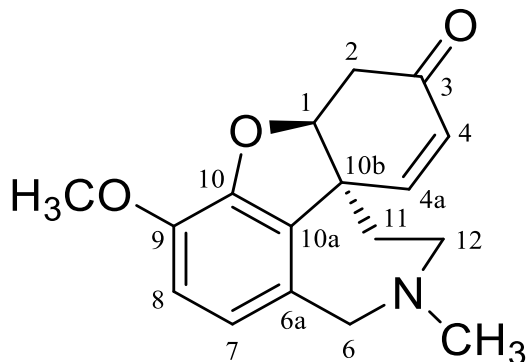
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -98^\circ$ (c = 0,15; CHCl₃)

5.2.6 NPE-6: Narwedín

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu narwedín¹⁹⁴.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 285,343

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 285 (M⁺, 85), 284 (100), 242 (15), 216 (20), 199 (20), 174 (30).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.9 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-4a), 6.7 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-8), 6.6 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-7), 6.0 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-4), 4.7 (1H, m, H-1), 4.1 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-6a), 3.8 (3H, s, OCH₃), 3.8 (1H, d, J = 14.9 Hz, H-6), 3.3 (1H, t, H-12), 3.1 (2H, m, H-2, H-12), 2.7 (1H, dd, J = 13.9, 2.5 Hz, H-2), 2.5 (3H, s, NCH₃), 2.3 (1H, dt, H-11), 1.9 (1H, d, J = 13.8 Hz, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

194.4 (C-3), 147.0 (C-9), 144.3 (C-4a), 144.0 (C-10), 130.5 (C-10a), 129.4 (C-6a), 127.1 (C-4), 122.0 (C-7), 111.8 (C-8), 88.0 (C-1), 60.7 (C-6), 56.0 (OCH₃), 54.1 (C-12), 49.0 (C-10b), 42.4 (NCH₃), 37.3 (C-2), 33.2 (C-11).

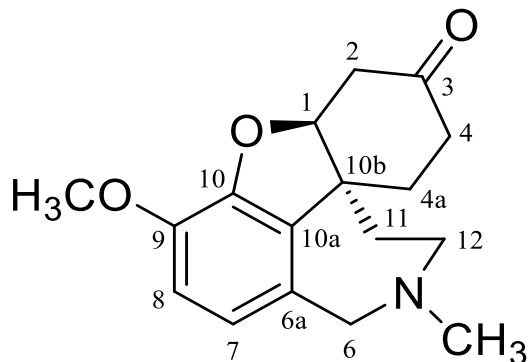
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 20,7^\circ$ ($c = 0,097$; CHCl₃)

5.2.7 NPE-7: Lykoraminon

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu lykoraminon¹⁹⁵.

Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 287,359

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M⁺, 72), 286 (100), 272 (5), 230 (8), 218 (14), 202 (22), 187 (15), 115 (15), 44 (18).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.69 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-4a), 6.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 4.78 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-7), 4.16 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-4), 3.85 (1H, m, H-1), 3.70 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-6a), 3.28 (3H, s, OCH₃), 3.15 (1H, d, $J = 14.9$ Hz, H-6), 3.02 (1H, t, H-12), 2.98 (2H, m, H-2, H-12), 2.75 (1H, dd, $J = 13.9, 2.5$ Hz, H-2), 2.32 (3H, s, NCH₃), 2.09 (1H, dt, H-11), 1.66 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

208.8, 146.7, 143.7, 131.7, 129.0, 122.3, 111.0, 88.3, 59.8, 55.9, 54.0, 47.5, 41.9, 40.1, 36.2, 35.6.

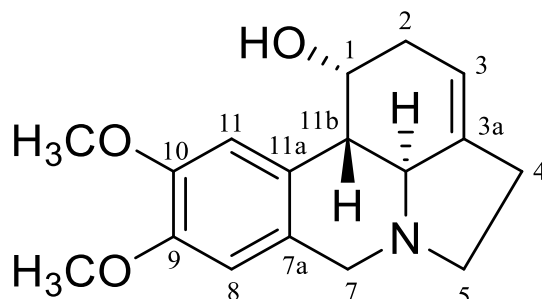
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 175,5^\circ$ (c = 0,098; CHCl₃)

5.2.8 NPE-8: Pluviin

Látka byla určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu pluviin^{192,193}.

Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 287,359

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M⁺, 82), 286 (49), 268 (52), 243 (66), 242 (100), 228 (23), 121 (17), 77 (17), 41 (15).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.74 (s, H-11), 6.64 (s, H-8), 5.97 (dd, $J = 5.9, 1.0$, Hz, H-1), 5.39 (d, $J = 2.2$ Hz, H-3), 4.26 (dd, $J = 5.9, 1.0$, Hz, H-1), 4.13 a 3.50 (1H each, d, $J = 14.5$ Hz, H2-7), 3.34 a 2.37 (1H, m, H2-5), 2.76 (d, $J = 9.9$ Hz, H-11c), 2.66 (d, $J = 9.9$ Hz, H-11b), 2.62 a 2.33 (m, H2-2), 2.59 (m, H2-4), 114.5-2.0 (10H).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

46.6, 46.6, 63.3, 66.3, 79.1, 85.6, 87.7, 91.9, 122.0, 123.4, 131.9, 136.1, 139.4, 152.4, 164.2.

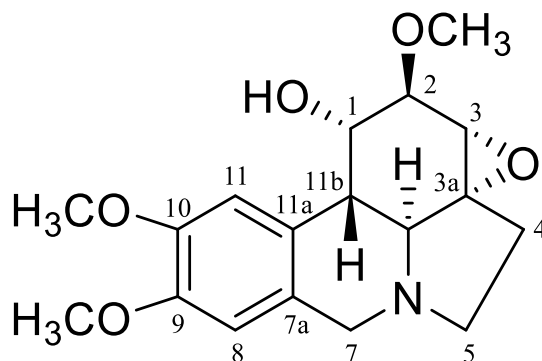
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -180^\circ$ (c = 0,1; MeOH)

5.2.9 NPE-9: Inkartin

Látka byla určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu inkartinin¹⁹⁶.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₅



Molekulová hmotnost

Mr = 333,38

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 333 (M⁺, 60), 332 (100), 296 (10), 259 (82), 258 (80), 244 (9), 214 (5), 162 (4).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.78 (1H, s, H-11), 6.57 (1H, s, H-8), 4.46 (1H, s, H-1), 4.07 (1H, d, J = 14.0 Hz, H-7), 3.85 (1H, s, H-2), 3.65 (1H, dd, J = 14.0, 1.0 Hz, H-7), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.54 (3H, s, OCH₃), 3.48 (1H, d, J = 1.0 Hz, H-3), 3.20 (1H, ddd, J = 9.0, 7.5, 2.0 Hz, H-5), 2.82 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-11b), 2.59 (1H, ddd, J = 10.3, 9.0, 6.5 Hz, H-5), 2.56 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-11c), 2.39 (1H, ddd, J = 14.5, 10.3, 7.5 Hz, H-4), 2.00 (1H, ddd, J = 14.5, 6.5, 2.0 Hz, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

147.9 (C-10), 147.8 (C-9), 128.5 (C-7a), 127.9 (C11a), 110.7 (C-8), 107.6 (C-11), 78.2 (C-2), 67.7 (C-1), 66.9 (C-4), 61.3 (C-11c), 59.2 (OCH₃), 59.0 (C-3), 56.7 (C-7), 56.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 53.0 (C-5), 40.1 (C-11b), 30.1 (C-4).

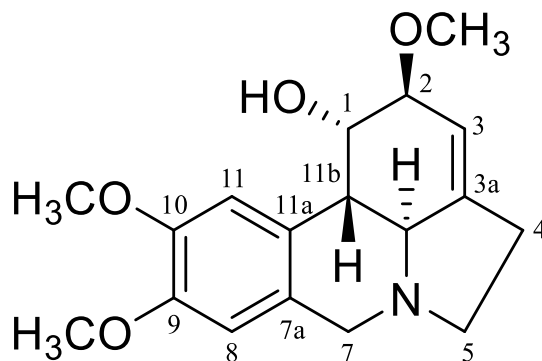
Optická otáčivost

Látky nebylo dostatečné množství, aby mohla být změřena i optická otáčivost.

5.2.10 NPE-10: Galanthin

Látka byla určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu galanthin¹⁹⁷.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 317,385

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 317 (M⁺, 45), 268 (16), 243 (100), 242 (99), 162 (9), 125 (13), 110 (7).

NMR analýza

¹H NMR (300 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C)¹⁹⁸:

4.66 (br, H-1), 3.76 (m, H-2), 5.61 (br, H-3), 2.64 (m, 2H-4), 2.35 (q, J = 8.7 Hz, H-5 α), 3.37 (m, H-5 β), 8.50 (d, J = 14 Hz, H-7 α), 4.17 (d, J = 14 Hz, H-7 β), 6.85 (s, H-8), 6.63 (s, H-11), 2.63 (m, H-11b), 2.74 (d, J = 11,6, H-11c), 3.90 (s, C-10 -OCH₃), 3.85 (s, C-9 -OCH₃), 3.52 (s, C-2 -OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C)¹⁹⁹:

147.8 (C-9), 147.6 (C-10), 143.9 (C-3a), 129.3 (C-7a), 126.6 (C-11a), 115.1 (C-3), 110.8 (C-8), 108.0 (C-11), 81.0 (C-2), 68.3 (C-1), 60.9 (C-11c), 57.3 (OCH₃), 56.6 (C-7), 56.0 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 53.8 (C-5), 41.5 (C-11b), 28.5 (C-4).

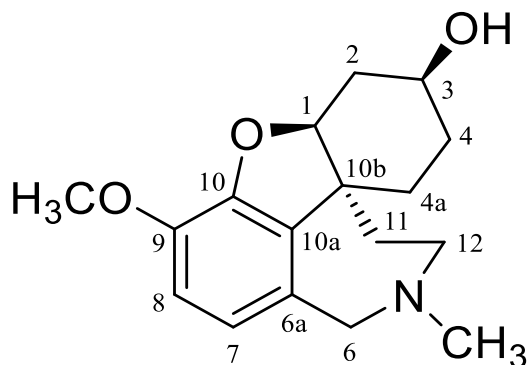
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -56^\circ$ (c = 0,01; MeOH)

5.2.11 NPE-11: Lykoramin

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu lykoramin²⁰⁰.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 289,37

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 289 (M⁺, 64), 288 (100), 274 (19), 232 (19), 202 (22), 115 (38).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.57 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8), 6.51 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 4.8 (1H, m, H-1), 3.98 (1H, m, H-3), 3.92 (1H, d, J = 15 Hz, H-6a), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.54 (1H, d, J = 15 Hz, H-6), 3.12 (1H, t, H-12), 2.96 (1H, t, H-12), 2.4 (1H, d, J = 16 Hz, H-2), 2.29 (3H, s, NCH₃), 1.4 – 1.9 (1H, m, H-2), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4a), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.2 (C-9), 144.0 (C-10), 136.3 (C-10a), 129.1 (C-6a), 121.6 (C-7), 111.3 (C-8), 89.8 (C-1), 65.2 (C-3), 60.4 (C-6), 55.9 (OCH₃), 54.1 (C-12), 46.7 (C-10b), 41.9 (NCH₃), 31.7 (C-4a), 31.5 (C-2), 27.6 (C-4), 23.9 (C-11).

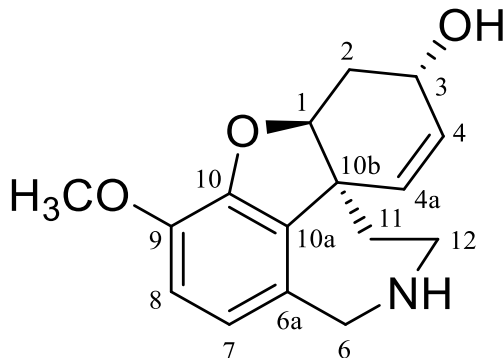
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 67^\circ$ (c = 0,269; CHCl₃)

5.2.12 NPE-12: Epinorgalanthamin

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu epinorgalanthamin^{201,202}.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 273,332

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 273 (M⁺, 97), 272 (100), 230 (36), 202 (29), 174 (16), 115 (16).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.68 (1H, d, J = 8 Hz, H-8), 6.62 (1H, d, J = 8 Hz, H-7), 6.05 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-4), 5.98 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-4), 4.62 (1H, s, H-1), 4.15 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-6β), 3.93 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-6α), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.38 (1H, dt, J = 14.7, 3.6 Hz, H-12β), 3.22 (1H, m, H-12α), 2.68 (1H, dd, J = 15.7, 3.5 Hz, H-2β), 2.04 (1H, ddd, J = 15.7, 5, 2.4 Hz, H-2α), 1.88 (1H, dt, J = 13.5, 3.2 Hz, H-11α), 1.80 (1H, td, J = 13.5, 13.5, 3.6 Hz, H-11β).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

146.2 (C-9), 144.1 (C-10), 133.1 (C-10a), 132.1 (C-6a), 127.6 (C-4), 127.1 (C-4a), 120.9 (C-7), 111.3 (C-8), 88.4 (C-1), 61.9 (C-3), 55.9 (OCH₃), 53.5 (C-6), 48.5 (C-10b), 46.8 (C-12), 39.7 (C-11), 29.9 (C-2).

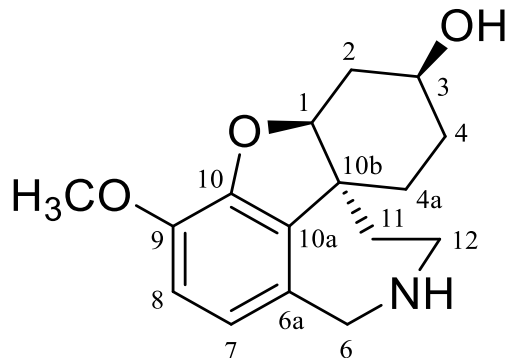
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -76^\circ$ (c = 0,1; MeOH)

5.2.13 NPE-13: Norlykoramin

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu norlykoramin²⁰³.

Sumární vzorec: C₁₆H₂₁NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 275,348

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 275 (M⁺, 75), 274 (100), 202 (10), 188 (19), 115 (14).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.61 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8), 6.51 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 4.32 (1H, m, H-1), 4.04 (1H, m, H-3), 3.90 (1H, d, J = 15 Hz, H-6a), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.54 (1H, d, J = 15 Hz, H-6), 3.12 (1H, t, H-12), 2.96 (1H, t, H-12), 2.4 (1H, d, J = 16 Hz, H-2), 1.4 – 1.9 (1H, m, H-2), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4a), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.2 (C-9), 144.0 (C-10), 136.3 (C-10a), 129.1 (C-6a), 121.6 (C-7), 111.3 (C-8), 89.8 (C-1), 65.2 (C-3), 60.4 (C-6), 55.9 (OCH₃), 54.1 (C-12), 46.7 (C-10b), 31.7 (C-4a), 31.5 (C-2), 27.6 (C-4), 23.9 (C-11).

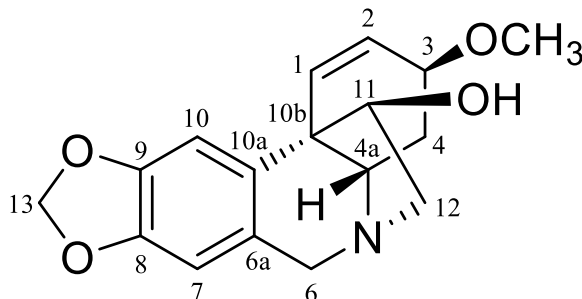
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -40^\circ$ (c = 0,5; CHCl₃)

5.2.14 NPE-14: Haemanthamin

Látka byla určena jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu haemanthamin²⁰³.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 301,342

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 301 (M⁺, 15), 272 (100), 240 (20), 257 (21), 211 (16), 181 (25).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.74 (1H, s, H-10), 6.41 (1H, s, H-7), 6.36 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-1), 6.25 (1H, dd, J = 10.2, 4.7 Hz, H-2), 5.81 (1H, s, OCH₂O), 5.76 (1H, s, OCH₂O), 4.25 (1H, d, J = 17.1 Hz, H-6), 3.96 (1H, dd, J = 6.7, 3.3 Hz, H-11), 3.82 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, d, J = 17.1 Hz, H-6), 3.36 (3H, s, OCH₃), 3.25 – 3.30 (2H, m, H-12, H-4a), 3.19 (1H, dd, J = 14.1, 3.3 Hz, H-12), 2.11 (1H, ddd, J = 13.8, 5.4, 1.8 Hz, H-4), 1.96 (1H, m, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.5 (C-8), 147.0 (C-9), 135.0 (C-10a), 128.0 (C-1), 127.2 (C-2), 126.9 (C-6a), 106.9 (C-7), 103.3 (C-10), 101.0 (OCH₂O), 80.0 (C-11), 73.0 (C-3), 63.3 (C-6), 62.7 (C-4a), 61.5 (C-12), 56.0 (OCH₃), 50.0 (C-10b), 29.5 (C-4).

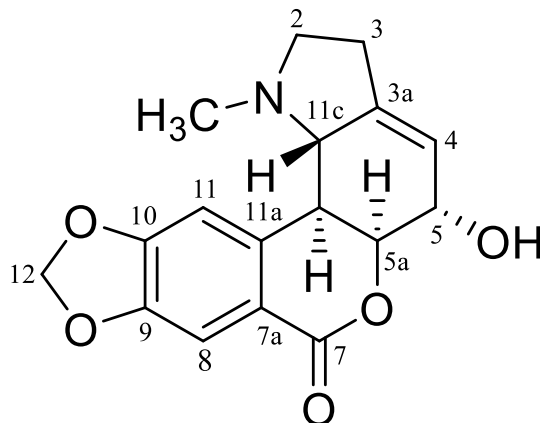
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 37^\circ$ (c = 0,29; CHCl₃)

5.2.15 NPE-15: Hippeastrin

Látka byla určena jako alkaloid homolykorinového strukturního typu hippeastrin²⁰⁴.

Sumární vzorec: C₁₆H₂₁NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 315,326

MS analýza

MS (ED): m/z (%) = 297 (10), 279 (9), 190 (28), 126 (84), 125 (100), 124 (84), 96 (99).

MS (ESI): m/z (%) = 316 (M+1, 3), 298 (100), 287 (10), 280 (47), 262 (19), 239 (43), 191 (10).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

7.48 (1H, s, H-11), 6.98 (1H, s, H-8), 6.08 (1H, s, OCH₂O), 6.07 (2H, s, OCH₂O), 5.70 (1H, s, H-4), 4.61 (1H, s, H-5a), 4.38 (1H, s, H-5), 3.25 (1H, m, H-2), 3.04 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-11b), 2.73 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-11c), 2.54 (2H, m, H-3), 2.31 (1H, dd, $J = 17.2, 8.5$ Hz, H-2), 2.10 (3H, s, NCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

165.0 (C-7), 151.9 (C-10), 148.0 (C-9), 142.4 (C-3a), 118.0 (C-7a), 138.8 (C-11a), 119.4 (C-4), 109.8 (C-8), 108.5 (C-11), 102.1 (OCH₂O), 82.2 (C-5a), 67.1 (C-11c), 66.2 (C-5), 55.9 (C-2), 42.9 (NCH₃), 38.4 (C-11b), 27.3 (C-3).

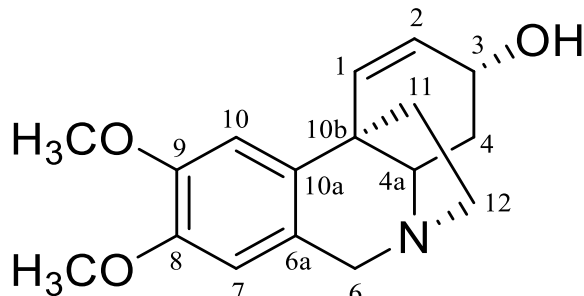
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 142^\circ$ ($c = 0,105$; CHCl₃)

5.2.16 NPE-16: Epimaritidin

Látka byla určena jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu epimaritidin²⁰⁵.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 287,359

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M⁺, 100), 270 (15), 258 (10), 244 (30), 215 (75), 202 (50), 203 (50), 189 (20).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.81 (1H, s, H-10), 6.52 (1H, s, H-7), 6.50 (1H, dd, J = 10.2, 2.1 Hz, H-1), 5.80 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-2), 4.44 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-6), 4.46 (1H, m, H-3), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.81 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-6), 3.45 (1H, ddd, J = 14.3, 10.5, 4.6 Hz, H-12), 3.27 (1H, dd, J = 13.2, 3.2, H-4a), 2.94 (1H, ddd, J = 14.3, 8.9, 5.8 Hz, H-12), 2.26 – 2.05 (3H, m, H-4, H-11, H-11), 1.63 (1H, ddd, J = 12, 12, 12 Hz, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

147.4 (C-8, C-9), 137.5 (C-10a), 131.5 (C-2), 128.9 (C-1), 124.7 (C-6a), 107.9 (C-7), 105.6 (C-10), 67.7 (C-3), 66.8 (C-4a), 61.9 (C-6), 56.1 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 53.3 (C-12), 45.1 (C-11), 44.1 (C-10b), 35.0 (C-4).

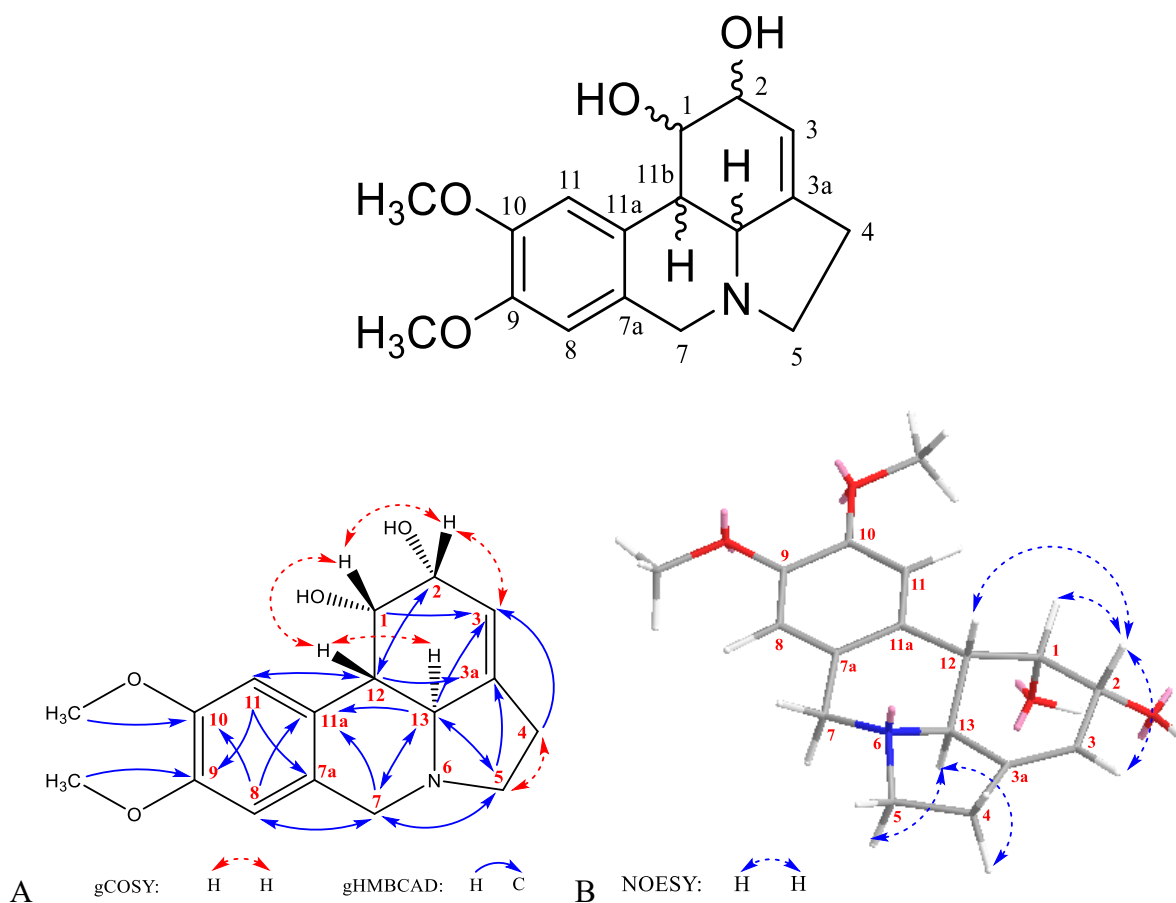
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -127,6^\circ$ ($c = 0,464$; MeOH)

5.2.17 NPE-17: 9-*O*-Methylpseudolykorin isomer

Tato látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost, rozpustnost) určena jako isomer 9-*O*-methylpseudolykorinu. Provedení X-ray analýzy za účelem stanovení absolutní konfigurace nebylo možné, neboť látka netvoří monokrystaly.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₉NO₄



Obr. 24 NMR analýza isomeru 9-*O*-methylpseudolykorinu A - gCOSY a B - NOESY korelace.

Molekulová hmotnost

Mr = 303,35

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 303 (M⁺, 29), 302 (21), 286 (8), 284 (19), 266 (15), 244 (12), 243 (73), 242 (100), 162 (9).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, DMSO 25 °C):

6.81 (1H, s, H-11), 6.68 (1H, s, H-8), 5.37–5.34 (1H, m, H-3), 4.86 (1H, bs, -OH), 4.75 (1H, bs, -OH), 4.34 (1H, bs, H-1), 4.04 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-7), 3.98 (1H, bs, H-2), 3.75 (3H, s, C-10 -OCH₃), 3.70 (3H, s, C-9 -OCH₃), 3.36–3.29 (1H, m, overlapped, H-7), 3.21 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, H-5), 2.60 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-13), 2.55–2.51 (1H, m, overlapped, H-12), 2.48–2.37 (2H, m, overlapped, H-4), 2.20 (1H, dt, $J = 17.5, 8.3$ Hz, H-5).

¹³C NMR (125 MHz, δ, DMSO, 25 °C):

147.3 (C-10), 147.0 (C-9), 142.0 (C-3a), 128.8 (C-7a), 128.4 (C-11a), 118.6 (C-3), 111.0 (C-8), 108.8 (C-11), 72.0 (C-2), 70.3 (C-1), 61.1 (C-13), 56.6 (C-7), 55.8 (C-9 -OCH₃), 55.7 (C-10 -OCH₃), 53.6 (C-5), 40.3 (C-12), 28.2 (C-4).

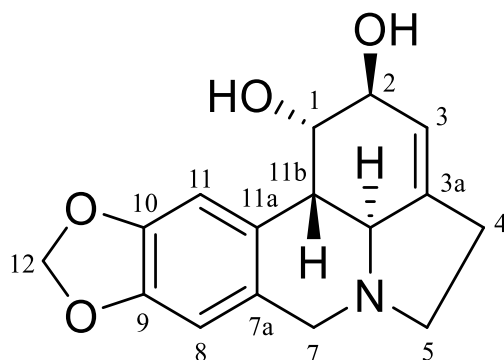
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -92^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH)

5.2.18 NPE-18: Lykorin

Tato látka byla identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu lykorin^{206,207}.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₄



Molekulová hmotnost

$M_r = 287,315$

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M^+ , 21), 286 (14), 268 (17), 227 (78), 226 (100), 147 (19), 119 (16), 44 (36).

NMR analýza¹⁹²

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.98 (s, H-11), 6.80 (s, H-8), 5.95 (s, H₂-12), 5.77 (br s, H-3), 4.58 (br s, H-1), 4.48 a 4.19 (1H each, d, $J = 14.0$ Hz, H₂-7), 4.26 (m, H-2), 3.95 (d, $J = 11.8$ Hz, H-11c), 3.75 a 3.49 (1H each, m, H₂-5), 2.99 (d, $J = 11.8$ Hz, H-11b), 2.88 (m, H₂-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

149.6 (C-9), 148.1 (C-10), 137.9 (C-3a), 130.7 (C-7a), 125.7 (C-11a), 122.9 (C-3), 108.8 (C-8), 106.4 (C-11), 102.8 (C-12), 71.9 (C-2), 70.1 (C-1), 61.8 (C-11c), 55.1 (C-5), 54.2 (C-7), 38.2 (C-11b), 30.3 (C-4).

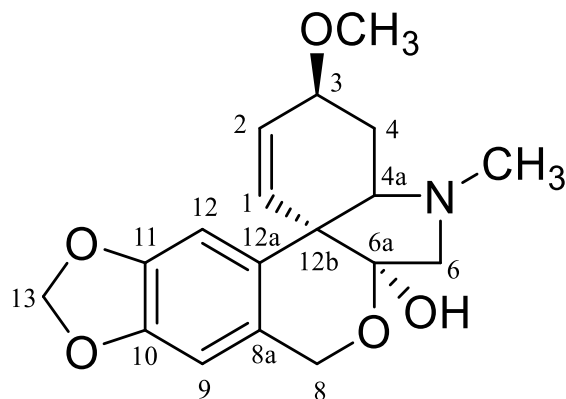
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -104^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH)

5.2.19 NPE-19: Tazettin

Tato látka byla identifikována jako alkaloid tazettinového strukturního typu tazettin²⁰⁸.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁NO₅



Molekulová hmotnost

Mr = 331,368

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 331 (M⁺, 20), 316 (18), 298 (27), 247 (100), 230 (15).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.86 (1H, s, H-12), 6.50 (1H, s, H-9), 6.14 (1H, dt, $J = 10.4, 1.4$ Hz, H-2), 5.90 (2H, s, OCH₂O), 5.61 (1H, dt, $J = 10.4, 1.8$ Hz, H-1), 4.96 (1H, dd, $J = 14.7, 0.5$ Hz, H-8), 4.63 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, H-8), 4.11-4.17 (1H, m, H-3), 3.46 (3H, s, OCH₃), 3.30 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-6), 2.85-2.89 (1H, m, H-6a), 2.68 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-6), 2.40 (3H, s, NCH₃), 2.19-2.27 (1H, m, H-4), 1.63 (1H, ddd, $J = 13.7, 10.1, 2.4$ Hz, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

146.6, 146.4, 130.6, 128.7, 128.0, 125.5, 109.3, 104.0, 102.0, 100.9, 72.9, 70.0, 65.5, 62.0, 56.1, 49.9, 42.0, 26.7.

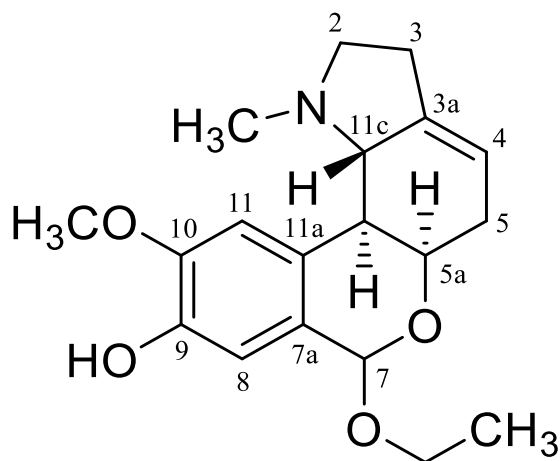
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 67,6^\circ$ ($c = 0,86$; CHCl₃)

5.2.20 NPE-20: Eugenin

Látka byla určena jako alkaloid homolykorinového strukturního typu eugenin²⁰⁹.

Sumární vzorec: C₁₉H₂₅NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 331,41

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 109 (100), 108 (15), 94 (5), 82 (3).

MS (ESI): m/z (%) = 332 (M+1, 100), 287 (3), 286 (8).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CD₃OD, 25 °C):

6.95 (1H, s, H-11), 6.58 (1H, s, H-8), 5.46 – 5.41 (1H, m, H-3), 4.81 – 4.76 (1H, m, H-1), 4.07 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-7), 3.87 (3H, s, C-10 -OCH₃), 3.50 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-7), 3.33 – 3.30 (1H, m, overlapped, H-5), 2.93 – 2.87 (1H, m, H-11c), 2.68 – 2.50 (4H, m, H-11b, H-4, H-2), 2.44 – 2.34 (2H, m, H-5, H-2).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CD₃OD, 25 °C):

148.1 (C-10), 146.4 (C-9), 139.6 (C-3a), 129.6 (C-7a), 127.3 (C-11a), 116.4 (C-3), 115.0 (C-8), 109.7 (C-11), 65.2 (C-1), 62.5 (C-11c), 57.4 (C-7), 56.5 (C-10 -OCH₃), 54.7 (C-5), 45.5 (C-11b), 37.0 (C-2), 29.2 (C-4).

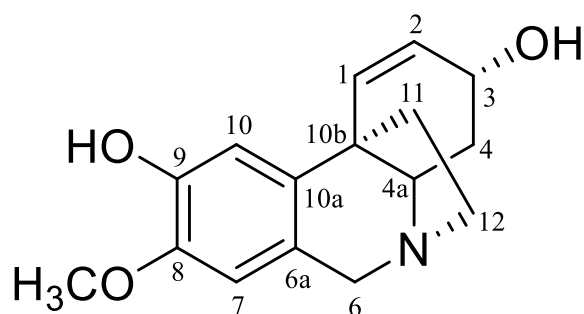
Optická otáčivost

Látka má omezenou rozpustnost a roztok se kalil, takže nebylo možné změřit optickou otáčivost.

5.2.22 NPE-22: 9-*O*-Demethylmaritidin

Tato látka byla na základě NMR identifikována jako 9-*O*-demethylmaritidin. V literatuře je znám 8-*O*-demethylmaritidin²¹¹, ale NMR spektra 9-*O*-demethylmaritidinu prozatím nebyla popsána.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₉NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 273,332

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 273 (M⁺, 100), 230 (24), 201 (83), 189 (52), 175 (20), 115 (18).

NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

6.88 (1H, s, H-10), 6.51 (1H, s, H-7), 6.51 (1H, dd, $J = 10.2, 2.2$ Hz, H-1), 5.79 – 5.74 (1H, m, H-2), 4.48 – 4.41 (2H, m, H-6, H-3), 3.84 (3H, s, C-8 -OCH₃), 3.81 (1H, d, $I = 16.9$ Hz, H-6), 3.50 – 3.42 (1H, m, H-12), 3.26 (1H, dd, $J = 13.3, 3.6$ Hz, H-4a), 2.98 – 2.90 (1H, m, H-12), 2.25 – 2.05 (3H, m, H-11, H-4), 1.66 – 1.53 (1H, m, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

145.0 (C-8), 144.0 (C-9), 138.2 (C-10a), 131.1 (C-2), 129.0 (C-1), 123.9 (C-6a), 109.2 (C-7), 108.5 (C-10), 67.8 (C-3), 66.7 (C-4a), 61.8 (C-6), 55.9 (C-8 -OCH₃), 53.2 (C-12), 44.9 (C-11), 44.0 (C-10b), 34.9 (C-4).

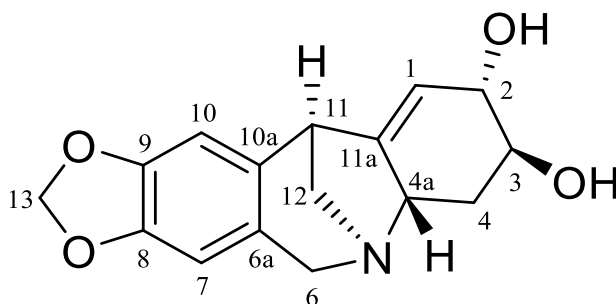
Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -127,9^\circ$ ($c = 0,122$; CHCl_3)

5.2.23 NPE-23: Pankracin

Látka byla určena jako alkaloid montaninového strukturního typu pankracin²¹².

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₄



Molekulová hmotnost

$M_r = 287,315$

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M^+ , 100), 286 (21), 270 (18), 243 (19), 214 (18), 199 (19), 185 (26), 115 (16).

NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, δ , CD_3OD , 25 °C):

6.61 (1H, s, H-10), 6.54 (1H, s, H-7), 5.88 – 5.85 (2H, m, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 5.55 – 5.52 (1H, m, H-1), 4.32 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-6), 3.97 – 3.94 (1H, m, H-3), 3.88 – 3.85 (1H, m, H-2), 3.83 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-6), 3.53 – 3.46 (1H, m, H-4a), 3.39 – 3.37 (1H, m, H-11), 3.08 – 3.06 (2H, m, H-12), 2.13 – 2.07 (1H, m, H-4), 1.58 (1H, td, $J = 12.2, 2.7$ Hz, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CD_3OD , 25 °C):

153.5 (C-11a), 148.3 (C-8), 147.7 (C-9), 133.5 (C-10a), 125.0 (C-6a), 116.4 (C-1), 108.3 (C-10), 107.8 (C-7), 102.1 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 72.5 (C-3), 70.1 (C-2), 61.4 (C-6), 59.5 (C-4a), 56.2 (C-12), 46.7 (C-11), 31.6 (C-4).

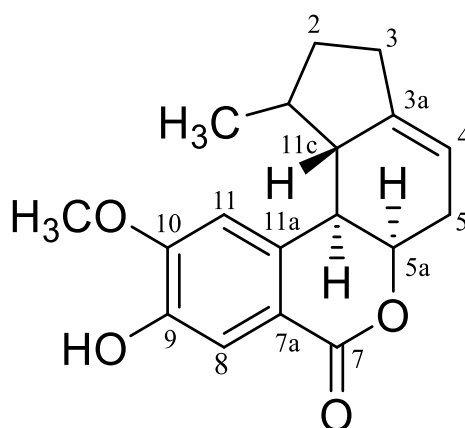
Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -68^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH)

5.2.24 NPE-24: 9-*O*-Demethylhomolykorin

Látka byla identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu 9-*O*-demethylhomolykorin¹⁹⁰.

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$



Molekulová hmotnost

$M_r = 301,342$

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 192 (0,5), 164 (2), 110 (8), 109 (100), 108 (23), 94 (3), 82 (3).

MS (ESI): m/z (%) = 302 (100, M+1), 252 (5), 181 (3).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

7.59 (1H, s, H-8), 6.98 (1H, s, H-11), 5.52 - 5.48 (1H, m, H-4), 4.79 - 4.76 (1H, m, H-5a), 3.94 (3H, s, OCH₃), 3.17 - 3.12 (1H, m, H-2), 2.76 - 2.70 (1H, m, H-11c), 2.66 (1H, dd, *J* = 9.7, 2.1 Hz, H-11b), 2.62 - 2.58 (2H, m, H-5), 2.53 - 2.47 (2H, m, H-3), 2.26 (1H, q, *J* = 9.5 Hz, H-2), 2.00 (3H, s, NCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

165.6 (C-7), 150.8 (C-10), 145.6 (C-9), 140.6 (C-3a), 136.7 (C-11a), 117.6 (C-7a), 116.0 (C-8), 115.4 (C-4), 110.3 (C-11), 77.5 (C-5a), 66.5 (C-11c), 56.5 (C-2), 56.3 (OCH₃), 44.0 (C-11b), 43.7 (NCH₃), 31.2 (C-5), 27.9 (C-3).

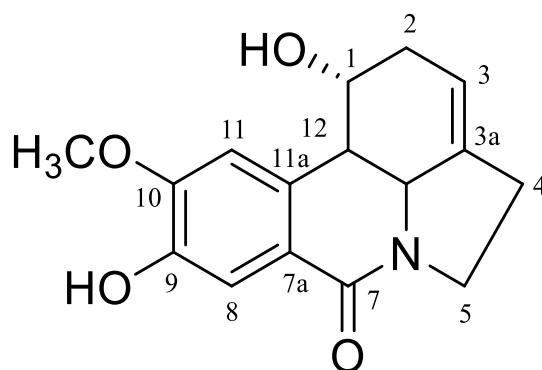
Optická otáčivost

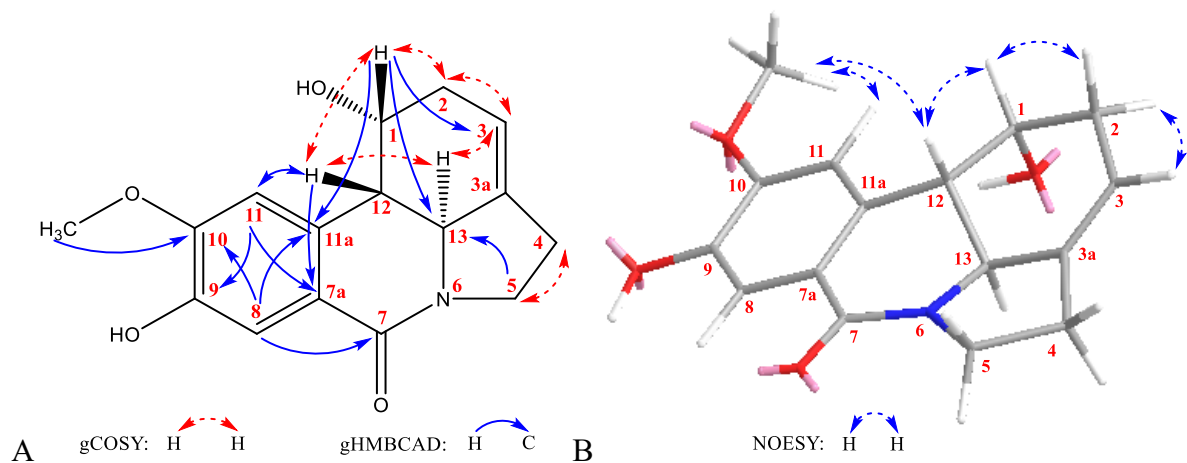
$[\alpha]_D^{25} = 215,7^\circ$ (*c* = 0,102; MeOH)

5.2.25 NPE-25: 7-Oxonorpluviin

Látka byla pomocí NMR určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu 7-oxonorpluviin a jedná se o novou, dosud nepopsanou látku.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₄





Obr. 25 NMR analýza 7-oxonorpluviinu A - gCOSY a B - NOESY korelace.

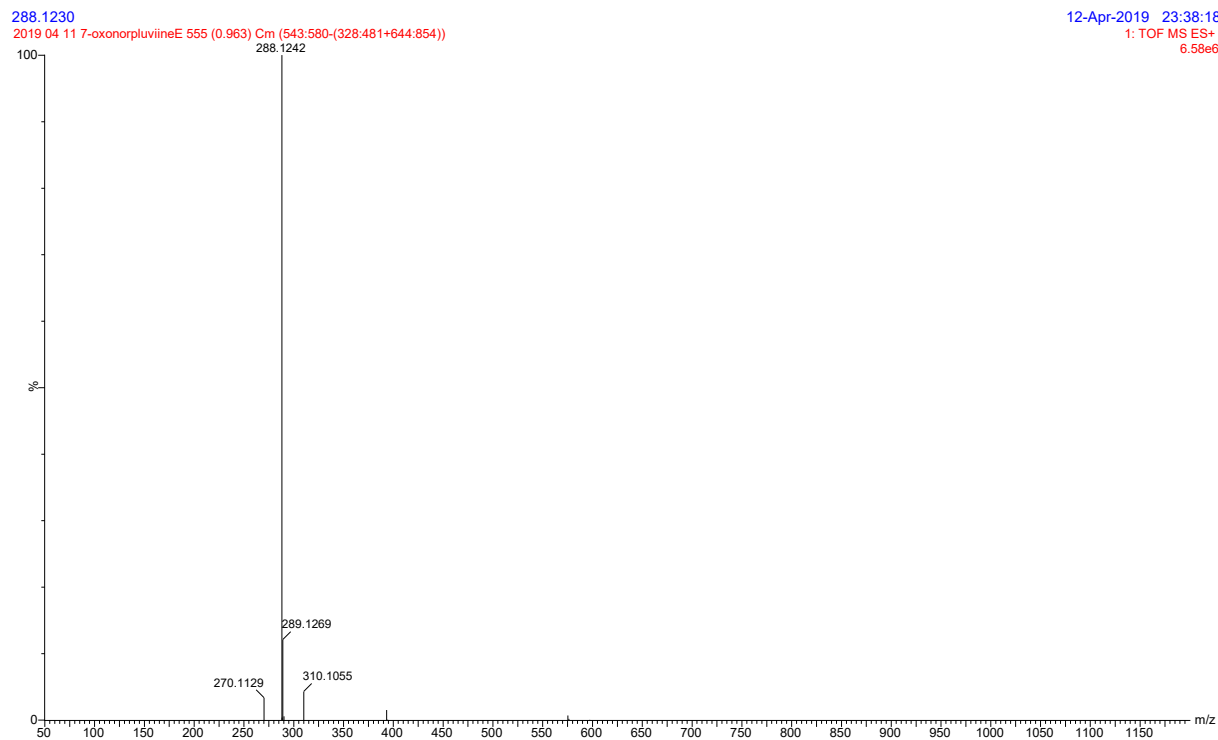
Molekulová hmotnost

Mr = 287,124

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 95 (100).

MS (ESI): m/z (%) = 288 (M+1), 276 (3), 242 (2).



Obr. 26 HRMS analýza 7-oxonorpluviinu provedená za účelem stanovení přesné Mr.

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CD₃OD, 25 °C):

7.45 (1H, s, H-8), 6.99 (1H, s, H-11), 5.71 – 5.67 (1H, m, H-3), 4.95 – 4.91 (1H, m, H-1), 3.98 (3H, s, C-10 -OCH₃), 3.53 – 3.47 (1H, m, H-11c), 3.35 – 3.25 (1H, m, H-5), 3.06 – 2.98 (1H, m, H-5), 2.84 (1H, dd, $J = 10.3, 2.2$ Hz, H-11b), 2.77 – 2.52 (4H, m, H-2, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CD₃OD, 25 °C):

167.6 (C-7), 154.5 (C-10), 148.1 (C-9), 137.7 (C-3a), 136.5 (C-11a), 118.3 (C-3), 117.4 (C-7a), 117.3 (C-8), 111.1 (C-11), 77.3 (C-1), 60.9 (C-11c), 56.7 (C-10 -OCH₃), 44.9 (C-5), 41.9 (C-11b), 32.2 (C-2), 29.5 (C-4).

Optická otáčivost

Látka byla velmi labilní a rozkládala se, tudíž nebylo možné změřit její optickou otáčivost.

5.3 Výsledky biologických testů a aktivit izolovaných alkaloidů

5.3.1 Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k enzymům spojených s Alzheimerovou chorobou

Izolované alkaloidy byly testovány na jejich schopnost inhibovat několik enzymů spojených s možnou terapií Alzheimerovy choroby – jmenovitě se jedná o cholinesterasy (*hAChE*, *hBuChE*; tab. 12), prolyloligopeptidasu (POP) a glykogen syntasasu kinasu-3 β (GSK-3 β ; tab. 13)

Tab. 12 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči *hAChE* a *hBuChE*.

Látka	<i>hAChE</i> IC ₅₀ (μ M)	<i>hBuChE</i> IC ₅₀ (μ M)	SI pro <i>hAChE</i>
Masonin	305 \pm 34	229 \pm 24	0,8
Homolykorin	64 \pm 4	151 \pm 20	2,4
Ismin	82 \pm 4	170 \pm 7	2,1
Karanin	321 \pm 42	487 \pm 55	1,5
Galanthamin	1,7 \pm 0,1	42,3 \pm 1,3	24,9
Narwedín	281 \pm 34	> 500	n.c.
Lykoraminon	> 500	> 500	n.c.
Pluviin	> 500	> 500	n.c.
Norlykoramin	> 500	> 500	n.c.
Inkartin	208 \pm 14	> 500	n.c.
Galanthin	> 500	> 500	n.c.
Lykoramin	55 \pm 5	> 500	n.c.
Epinorgalanthamin	21,2 \pm 4,0	134 \pm 21	6,4
Haemanthamin	> 500	> 500	n.c.
Hippeastrin	> 500	> 500	n.c.
Epimaritidin	> 500	> 500	n.c.
9- <i>O</i> -Methypseudolyorin isomer	> 500	> 500	n.c.
Lykorin	> 500	> 500	n.c.
Tazettin	> 500	> 500	n.c.
Eugenin	> 500	310 \pm 18	n.c.
Norpluviin	> 500	> 500	n.c.
9- <i>O</i> -Demethylmaritidin	197 \pm 20	> 500	n.c.
Pankracin	> 500	> 500	n.c.
9- <i>O</i> -Demethylhomolykorin	> 500	> 500	n.c.
7-Oxonorpluviin	n.t.	n.t.	n.c.
Huperzin A ^a	0,033 \pm 0,001	> 500	> 15,151
Galanthamin ^a	1,7 \pm 0,1	42,3 \pm 1,3	24,9

^astandard, n.t. netestováno, n.c. nespočítáno; SI = index selektivity

Tab. 13 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči POP a GSK-3β.

Látka	POP IC ₅₀ (μM)	GSK-3β (% inhibice)	GSK-3β IC ₅₀ (μM)
Masonin	314 ± 34	66 ± 4	27,9 ± 0,8
Homolykorin	173 ± 41	54 ± 1	n.t.
Ismin	> 500	t.	n.t.
Karanin	> 500	58 ± 9	30,8 ± 0,3
Galanthamin	> 500	n.t.	n.t.
Narwedín	907 ± 87	37 ± 0	n.t.
Lykoraminon	n.t.	39 ± 1	n.t.
Pluviin	n.t.	t.	n.t.
Norlykoramin	209 ± 14	t.	n.t.
Inkartin	> 500	n.t.	n.t.
Galanthine	> 500	26 ± 8	n.t.
Lykoramin	n.t.	t.	n.t.
Epinorgalanthamin	n.t.	t.	n.t.
Haemanthamin	> 500	52 ± 0	n.t.
Hippeastrin	> 500	11 ± 2	n.t.
Epimaritidin	> 500	45 ± 0	n.t.
9- <i>O</i> -Methypseudolykorin isomer	n.d.	t.	n.t.
Lykorin	> 500	33 ± 0	n.t.
Tazettin	> 500	49 ± 0	n.t.
Eugenin	130 ± 8	n.t.	n.t.
Norpluviin	148 ± 10	45 ± 4	n.t.
9- <i>O</i> -Demethylmaritidin	430 ± 157	t.	n.t.
Pankracin	> 500	t.	n.t.
9- <i>O</i> -Demethylhomolykorin	> 500	64 ± 0	30,0 ± 0,7
7-Oxonorpluviin	n.t.	n.t.	n.t.
Berberin ^a	142 ± 21	n.t.	n.t.
Z-Pro-prolinal ^a	2,75 × 10 ⁻³	n.t.	n.t.
SB-415286 ^a	n.t.	n.t.	70 nM

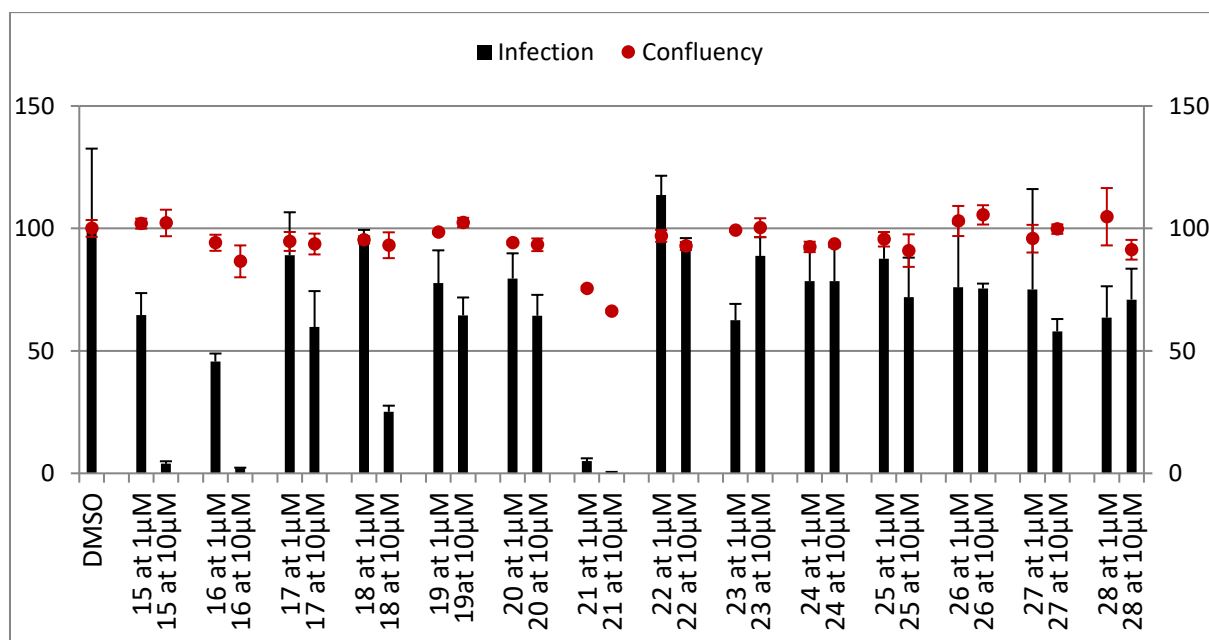
^a standard, t. probíhá testování, n.t. netestováno

5.3.2 Výsledky stanovení antimalarického působení izolovaných alkaloidů

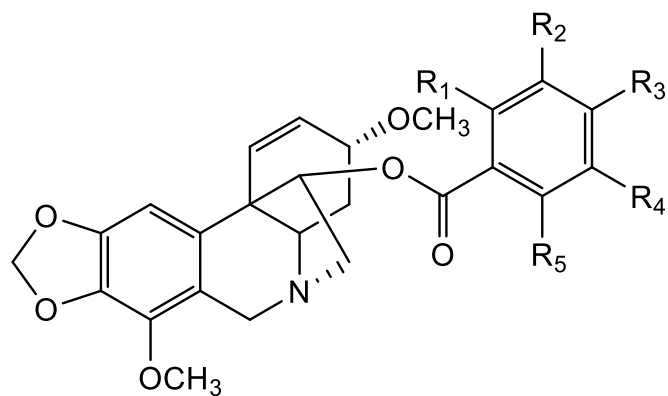
V rámci stáže ve výzkumné skupině Dr. Miguela Prudência v Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes v Lisabonu bylo provedeno stanovení inhibice jaterního stadia malárie způsobené *Plasmodium berghei*, což je původce malárie u myši, *in vitro* na buněčné linii HuH-7.

V rámci stáže bylo testováno celkem 61 AmA, jejich derivátů a isochinolinových alkaloidů. Další látky byly na stejném pracovišti testovány Mgr. Veronikou Hrabcovou z Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Dohromady bylo testováno přibližně 100 látek.

Základní screening byl proveden při koncentracích 10 μM a 1 μM (ilustračně viz obr. 28) a žádný z testovaných alkaloidů nevykazoval významnou inhibiční aktivitu vůči sporozoitům *Plasmodium berghei*. Mnohem zajímavější aktivitu vykázaly polosyntetické deriváty ambellinu – zejména ty s aromatickými substituenty (obr. 29, tab. 14). Ambellin, který byl na našem pracovišti izolován v rámci disertační práce Mgr. Niny Vaněčkové, Ph.D.²¹³, sám v předchozím stanovení žádnou významnou inhibiční aktivitu nevykázal. V rámci dalších studií⁷⁸ byly připraveny jeho různé deriváty, jež byly pro zajímavost testovány a vykázaly nadějnou aktivitu. U látek, které ze screeningu vyšly jako aktivní, byla stanovena a vypočítána hodnota IC_{50} .



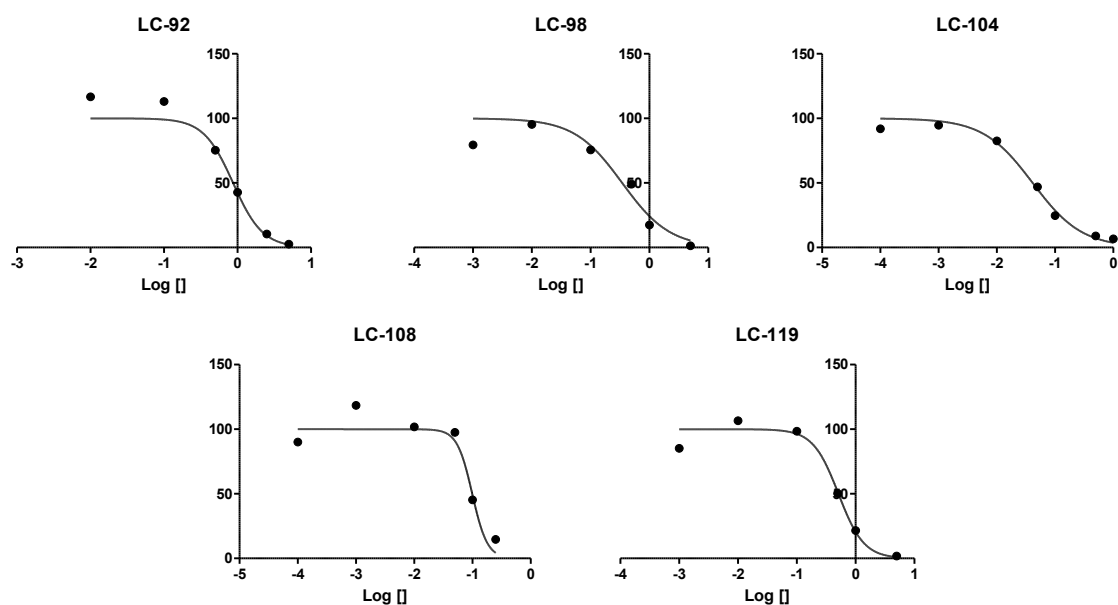
Obr. 27 Míra infekce a buněčné konfluency v % v porovnání s kontrolou. DMSO = kontrola, 16 = LC-92, 21 = LC-104



Obr. 28 Obecný vzorec derivátů ambellinu.

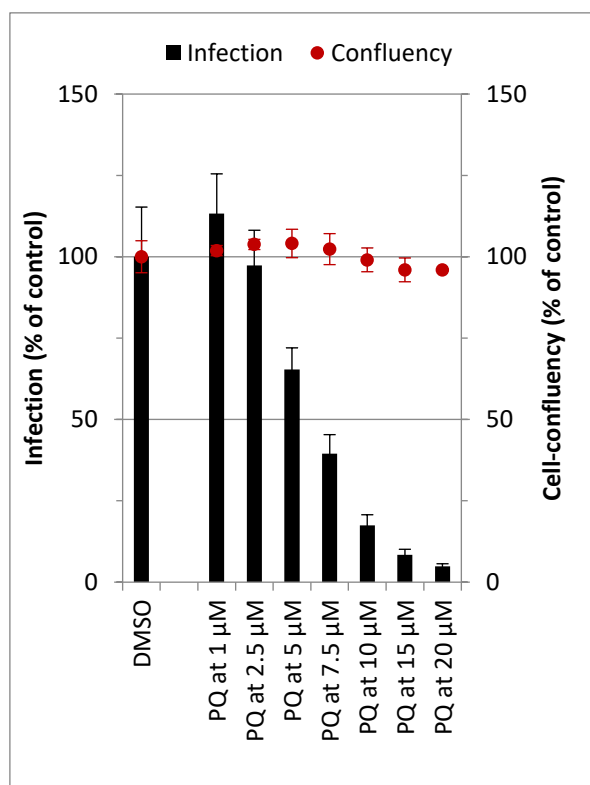
Tab. 14 Pět derivátů ambellinu s nejlepší inhibiční aktivitou vůči jaternímu stadiu *P. berghei*.

Kód derivátu	IC ₅₀ [μM]
LC-92	0,7263 ± 0,1255
LC-98	0,4023 ± 0,0811
LC-104	0,04826 ± 0,01416
LC-108	0,1094 ± 0,0237
LC-119	0,4354 ± 0,0668

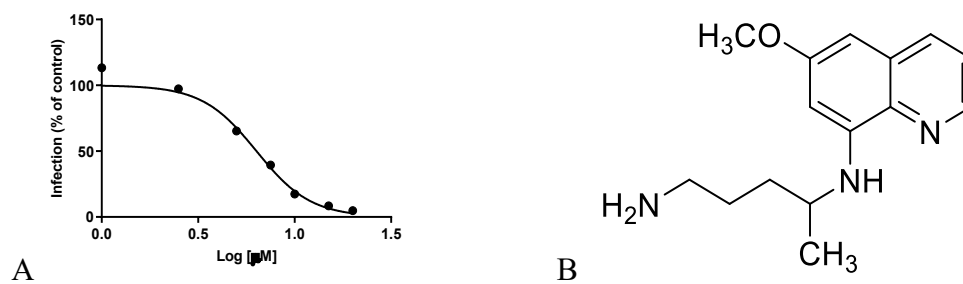


Obr. 29 Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity některých derivátů ambellinu na koncentraci.

Jako standard pro stanovení vůči jaterním stadiím malárie byl použit primachin, jehož $IC_{50} = 5,74 \pm 0,86 \mu\text{M}$ (obr. 30 a 31).



Obr. 30 Míra infekce a buněčné konfluency v % v porovnání s kontrolou (DMSO).



Obr. 31 A Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity na koncentraci B vzorec primachinu.

5.3.3 Výsledky stanovení cytotoxického působení izolovaných alkaloidů při koncentraci 10 μ M

Nejprve byla provedena screeningová single dose studie na 10 buněčných liniích, jejíž výsledky je možno vidět v heatmapě (tab. 15). Z této studie případně látky postoupily dále do stanovení IC_{50} . Toto stanovení bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Pro screening byly použity následující nádorové a nenádorové buněčné linie: Jurkat (akutní leukémie T lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom slinivky), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom), MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty) a NHDF (zdravé dermální fibroblasty).

U nejaktivnějších látek byly stanoveny koncentrace IC_{50} (tab. 16).

Tab. 15 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči buňkám nádorových linií (viabilita buněk 48 hodin po ovlivnění alkaloidem při koncentraci 10 μM).

Látka ¹	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5 ³
Masonin	76	105	109	110	94	102	117	98	98	99
Homolykorin	78	110	114	199	100	96	108	102	97	97
Ismín	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Karanin	99	99	111	58	82	102	68	99	77	-
Galanthamin	94	89	94	74	81	98	82	94	100	-
Narwedín	115	117	96	107	107	90	105	113	100	-
Lykoraminon	102	99	107	98	97	100	98	95	102	96
Pluviin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Norlykoramin	102	106	93	94	100	109	93	99	102	108
Inkartin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galanthin	98	103	93	64	97	163	93	114	97	-
Lykoramin	102	105	96	83	102	92	82	101	97	-
Epinorgalanthamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemanthamin	18	6	33	5	37	38	16	17	34	32
Hippeastrin	40	50	69	66	84	50	86	70	83	69
Epimaritidin	102	106	110	103	91	98	97	96	103	98
9-O-Methypseudolykorin isomer	97	99	87	88	90	95	98	88	93	96
Lykorin	5	9	27	5	36	39	15	27	27	25
Tazettin	93	95	83	57	76	101	84	94	92	-
Eugenin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Norpluviin	96	107	111	92	84	101	91	100	96	92
9-O-Demethylmaritidin	97	95	104	89	80	98	93	91	95	92
Pankracin	17	1	29	39	52	40	28	18	26	39
9-O-Demethylhomolykorin	100	100	109	106	92	94	96	102	103	93
7-Oxonorpluviine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxorubicin²	0	0	66	77	59	5	7	41	73	40
DMSO (0,1%)⁴	113	115	106	87	95	98	89	99	102	-

¹ c = 10 μmol/L; ² standard, c = 1 μmol/L; ³ kontrola – zdravé buňky; ⁴ kontrola - DMSO

Barevná vysvětlivka k heatmap (% přeživších buněk oproti kontrole po 48 hod inubaci při koncentraci 10 μM)

0 - 25	26 - 50	51 - 75	76 - 100
--------	---------	---------	----------

Tab. 16 Hodnoty IC₅₀ vůči jednotlivým buněčným liniím [μ M].

Buněčná linie	Haemanthamin	Lykoryn	Pankracin	Doxorubicin ¹
Jurkat	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1	5,1 ± 0,3	0,05 ± 0,02
MOLT-4	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2	2,7 ± 0,3	<0,01
A549	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	2,3 ± 0,4	0,43 ± 0,06
HT-29	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,3	2,6 ± 0,5	0,77 ± 0,24
PANC1	9,8 ± 0,4	0,7 ± 0,4	n.t.	n.t.
A2780	0,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1	5,1 ± 0,4	<0,01
HeLa	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,3	5,0 ± 0,3	0,55 ± 0,05
MCF-7	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,5	2,7 ± 0,4	0,44 ± 0,10
SAOS-2	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3	0,10 ± 0,17
MRC-5 ²	n.t.	n.t.	5,2 ± 0,3	0,72 ± 0,23
NHDF ²	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,3	n.t.	n.t.

¹ standard; ² kontrola – zdravé buňky; n.t. netestováno

Dále na poli cytotoxického působení AmA bylo ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze provedeno stanovení IC₅₀ u buněčných linií kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT-29) za použití zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva jako kontroly (FHs 74Int; tab. 17).

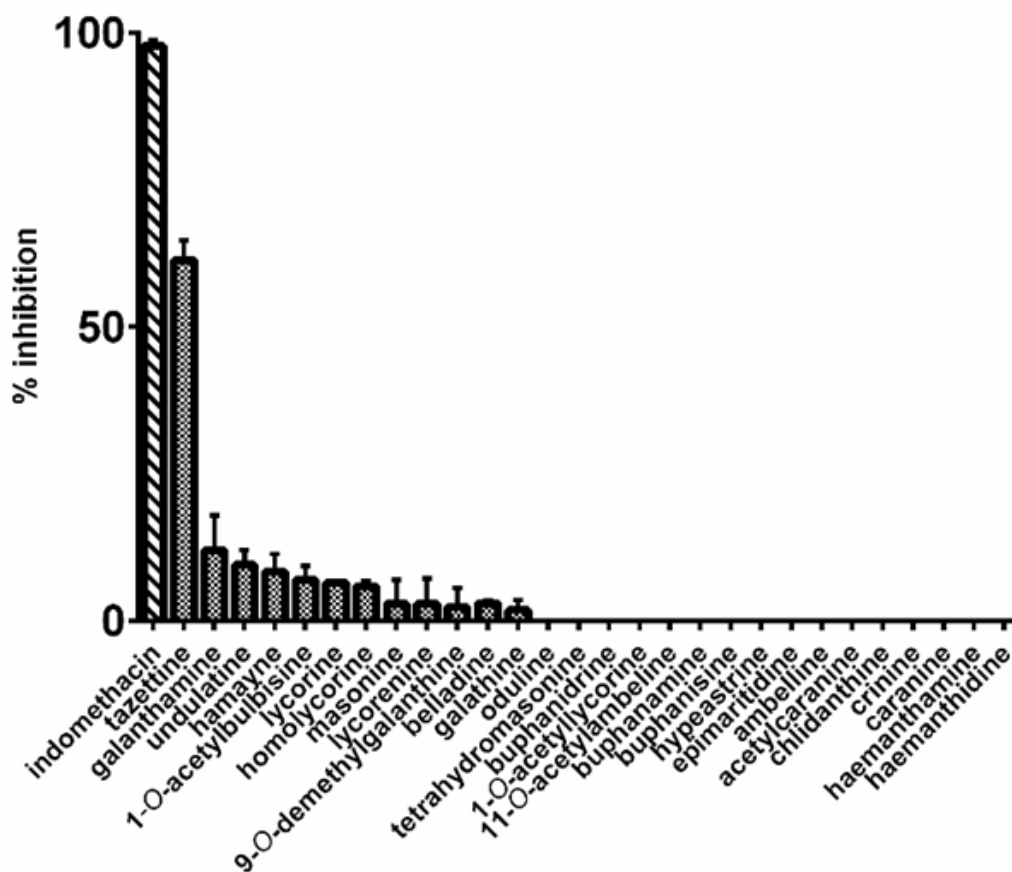
Tab. 17 Hodnoty IC₅₀ vůči dvěma buněčným liniím kolorektálního karcinomu [μ M].

Látka	Caco-2	HT-29	FHs 74Int ²
Masonin	>10	>10	>10
Homolykoryn	>10	>10	>10
Karanin	>10	>10	>10
Galanthamin	>10	>10	>10
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	>10
Hippeastrin	>10	>10	>10
Tazettin	>10	>10	>10
Vinorelbin ¹	0,03 ± 0,01	n.t.	4,0 ± 0,3

¹ standard; ² kontrola – zdravé buňky; n.t. netestováno

5.3.4 Výsledky stanovení inhibiční aktivity vůči AKR1C3 při koncentraci 20 μ M

Byla provedena screeningová studie alkaloidů při koncentraci 20 μ M, ale žádná z testovaných látek nevykazovala při této koncentraci významnou inhibiční aktivitu²¹⁴. Některé z těchto výsledků byly publikovány již v doktorské disertační práci PharmDr. Marcely Šafratové, Ph.D.¹⁹.



Obr. 32 Screening inhibiční aktivity Amaryllidaceae alkaloidů vůči AKR1C3.²¹⁴

Indometacin (pozitivní kontrola), látky izolované z *Narcissus* cv. Professor Einstein: **tazettin**, galanthamin, lykorin, homolykorin, masonin, hippeastrin, epimaritidin, karanin a haemanthamin.

6 DISKUSE

Předložená disertační práce měla za cíl představit Amaryllidaceae alkaloidy jako látky se zajímavým terapeutickým potenciálem pro léčbu různých chronických a dalších onemocnění. Čeleď Amaryllidaceae je významným zdrojem sloučenin, které přispívají k rozšíření portfolia při vývoji nových léčiv odvozených od přírodních látek. Jak již bylo zmíněno v úvodu práce, látky přírodního původu nebo látky od nich odvozené a inspirované tvoří v dnešní době až 50 % všech léčiv³, tudíž o jejich významu není pochyb.

Rostlinám z čeledi Amaryllidaceae je po fytochemické stránce věnována velká pozornost a jsou studovány stále další druhy, variety a pěstované odrůdy. Tento zájem se týká i rostlin rodu *Narcissus* L., jehož druhy a kultivary jsou pro svou dostupnost častým zdrojem rostlinného materiálu pro fytochemické a biologické studie. Do dnešní doby bylo studováno mnoho druhů a kultivarů narcisů³⁰, ale po důkladné rešerši bylo zjištěno, že *Narcissus* cv. Professor Einstein po fytochemické stránce doposud studován nebyl. Na základě výsledku screeningových studií¹⁸⁶ byl tento kultivar vybrán jako vhodný zdroj AmA různých strukturních typů, které by mohly disponovat zajímavými biologickými aktivitami. Dalším důvodem, byl obsah řady alkaloidů homolykorinového typu, neboť biologická aktivita těchto látek není příliš prozkoumaná.

V průběhu podrobné fytochemické studie bylo zpracováno 34,3 kg čerstvých cibulí NPE a z nich bylo získáno 31,7 g přečištěného alkaloidního extraktu. Pomocí sloupcové chromatografie, preparativní TLC a krystalizace bylo z tohoto extraktu izolováno celkem 25 alkaloidů, z nichž 24 již bylo popsáno a izolováno dříve. Jedna látka byla získána a strukturně popsána poprvé. Izolované alkaloidy patří do sedmi strukturních typů, jednalo se o strukturní typy běžně se vyskytující v rostlinách rodu *Narcissus* L. Pro strukturní analýzu izolovaných látek byly využity běžné spektroskopické metody jako MS, ¹H i ¹³C NMR analýza a optická otáčivost. Z alkaloidů galanthaminového typu byly izolovány galanthamin, epinorgalanthamin, narwedín, norlykoramin, lykoramin a lykoraminon. Z alkaloidů lykorinového typu bylo izolováno osm látek – lykorin, karanin, galanthin, inkartin, pluviin, norpluviin, 7-oxonopluiin a isomer 9-*O*-methylpseudolykorinu, jehož absolutní konfiguraci se nepodařilo určit, neboť nebylo možné připravit monokrystal pro strukturní rentgenovou analýzu. Nový alkaloid lykorinového typu byl pojmenován jako 7-oxonorpluviin, neboť jeho struktura se liší od norpluviinu pouze přítomností oxoskupiny v poloze C-7. Bohužel, tato látka se vyznačovala značnou nestabilitou již v průběhu izolačních prací a při studiu její struktury bylo nutno postupovat rychle a zčásti v prostředí argonu. Z těchto důvodů se podařilo izolovat pouze malé

množství této látky a nebylo možné studovat její biologickou aktivitu. Z alkaloidů homolykorinového strukturního typu byly izolovány látky eugenin, hippeastrin, homolykorin, masonin a 9-*O*-demethylhomolykorin. Eugenin je derivátem homolykorinu, který má v poloze C-7 místo oxoskupiny skupinu ethoxylovou. Tato látka byla v literatuře popsána pouze jednou (izolace z *Narcissus eugeniae* Fern. Casas)²⁰⁹, ale zatím nebyla publikována její NMR analýza. Vzhledem k přítomnosti ethoxyskupiny je možné, že se jedná o izolační artefakt vzniklý v průběhu přípravy sumárního extraktu. Z alkaloidů haemanthaminového strukturního typu byly izolovány haemanthamin, epimaritidin a 9-*O*-demethylmaritidin. 9-*O*-Demethylmaritidin byl již popsán dříve³⁰, ale prozatím nebyla publikována jeho NMR spektra, neboť mnohem častější je výskyt 8-*O*-demethylmaritidinu. Z alkaloidů pankratistatinového, tazettinového a montaninového typu bylo izolováno po jedné látce a to ismin, tazettin a pankracin.

Látky izolované v dostatečném množství byly podrobeny biologickým studiím v souvislosti s možnou terapií Alzheimerovy choroby, nádorových onemocnění a také malárie.

V souvislosti s potenciální terapií AD byly izolované alkaloidy studovány z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči enzymům, které se již uplatňují nebo jsou intenzivně studovány jako možné cíle zásahu při léčbě této choroby (*hAChE*, *hBuChE*, GSK-3 β a POP)^{33,56,101}.

Inhibitory cholinesteras jsou v současné době jedinými terapeuticky využívanými léčivy při mírné a střední fázi vývoje AD¹⁰⁰. Jedním z léčiv je i Amaryllidaceae alkaloid galanthamin ($IC_{50, hAChE} = 1,7 \pm 0,1 \mu M$), který byl izolován i v rámci této práce. Vzhledem k této skutečnosti byl galanthamin použit jako standard při stanovení IC_{50} vůči *hAChE* a *hBuChE*. Bohužel žádná z izolovaných látek nedisponovala inhibičním potenciálem srovnatelným s galanthaminem. Za zmínku stojí látka epinorgalanthamin ($IC_{50, hAChE} = 21,2 \pm 4,0 \mu M$), která vykazovala střední aktivitu vůči acetylcholinesterase. Z hlediska případného využití nepovažujeme tuto látku za perspektivní pro další vývoj a to i z důvodu jejího nízkého obsahu v rostlinném materiálu.

Inhibice POP se jeví jako zajímavý cíl v terapii neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění, vzhledem k tomu, že substráty tohoto enzymu jsou především neuropeptidy a hormony jako substance P, vasopressin, oxytocin a další¹¹⁵. Tyto látky hrají důležitou roli v modulaci funkcí centrálního nervového systému. Některé práce uvádějí, že inhibitory POP zároveň potlačují tvorbu A β v buňkách²¹⁹. Některé izolované alkaloidy vykazovaly zajímavý inhibiční potenciál vůči POP, neboť jejich inhibiční aktivita byla více či méně srovnatelná s aktivitou použitého standardu berberinu ($IC_{50} = 142 \pm 21 \mu M$), což je látka, která je v literatuře označována jako slibný inhibitor POP²¹⁵. Jedná se také o

alkaloid, konkrétně protoberberinového typu, který byl izolován v naší laboratoři z *Berberis vulgaris* L. (Berberidaceae)²²¹. Nejzajímavější aktivitu vykázal homolykorin ($IC_{50} = 173 \pm 41 \mu M$), norlykoramin ($IC_{50} = 209 \pm 14 \mu M$), eugenin ($IC_{50} = 130 \pm 8 \mu M$) a norpluviin ($IC_{50} = 148 \pm 10 \mu M$).

Dalším významným cílem v terapii nejen AD, ale i dalších onemocnění je GSK-3 β . Jedná se o enzym ovlivňující metabolismus glykogenu regulací glykogen synthasy. Postupně byly objeveny i další substráty tohoto enzymu (APP, presenilin, τ -protein atd.), čímž tento enzym zasahuje do řady procesů²¹⁶ a hraje důležitou roli v rozvoji AD, nádorových onemocnění, diabetes mellitus a dalších onemocnění^{64,65}. Zajímavá inhibiční aktivita v kontextu přírodních látek byla zjištěna u izolovaných alkaloidů masoninu ($IC_{50} = 27,9 \pm 0,8 \mu M$), karaninu ($IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu M$) a 9-*O*-demethylhomolykorinu ($IC_{50} = 30,0 \pm 0,7 \mu M$). Jako standard byla použita látka SB-415286 ($IC_{50} = 70 \text{ nM}$). Tyto látky disponovaly nejzajímavější aktivitou ze všech AmA doposud studovaných jako inhibitory GSK-3 β ¹⁷⁹. Z přírodních látek byla doposud nejzajímavější aktivita z hlediska inhibice GSK-3 β prokázána u manzaninových²¹⁷ a indolových alkaloidů izolovaných z různých druhů mořských hub²¹⁸. Hodnoty IC_{50} se u těchto látek pohybovaly v rozmezí 2,5 – 10 μM ^{217,218}.

Celkově lze shrnout, že některé izolované alkaloidy vykázaly zajímavé inhibiční aktivity vůči některým cílům spojeným s potenciální terapií AD. Vzhledem k izolaci některých látek v dostatečném množství budou aktivní alkaloidy podrobeny detailnějším studiím (typ inhibice enzymu) a použity pro přípravu pilotních derivátů za účelem vztahu struktura-aktivita,

AmA jsou v posledních letech intenzivně studovány z hlediska jejich cytotoxického působení na nádorové buňky¹³⁵⁻¹³⁸. Výhodou těchto látek je jejich značná selektivita vůči nádorovým buňkám a relativně nízká toxicita vůči buňkám zdravým. Mezi nejvýznamnější alkaloidy z hlediska protinádorové aktivity patří lykorin^{139,140}, haemanthamin^{144,145} a pankratistatin^{145,148}. Screeningově byly testovány i některé alkaloidy montaninového typu^{143,145}. Všechny zmíněné látky vykázaly v rámci předchozích studií výraznou toxicitu vůči širokému spektru nádorových buněčných linií. Z uvedených důvodů byly alkaloidy izolované z *Narcissus* cv. Professor Einstein v rámci spolupráce s Lékařskou fakultou UK v HK testovány *in vitro* na souboru vybraných nádorových liniích (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2). Za účelem stanovení toxicity studovaných látek vůči zdravým buňkám byly do screeningu zařazeny buněčné linie zdravých plicních (MRC-5) a dermálních (NHDF) fibroblastů.

Z izolovaných látek se jako nejzajímavější jevil pankracin, který disponoval cytotoxickou aktivitou vůči osmi z devíti testovaných nádorových buněčných linií, kdy se

hodnoty IC_{50} pohybovaly v rozmezí 2,3 – 5,1 μM (tab. 16). Tato látka byla do dnešní doby studována pouze screeningově a nebyly provedeny studie, které by vedly k objasnění způsobu ovlivnění buněčného cyklu, mechanismu účinku apod. Pankracin byl izolován v dostatečném množství umožňujícím zmíněné studie. Tyto experimenty jsou v současné době ve fázi vyhodnocování a v následující době budou uvedeny do publikace.

Izolované látky byly studovány i z pohledu možné inhibice enzymu AKR1C3. Tento enzym se podílí na redukci karbonylových skupin některých steroidů a prostaglandinů a ve zvýšené míře ho můžeme nalézt u pacientů s nádory prostaty. Z tohoto důvodu je hledání inhibitorů uvedeného enzymu žádoucí. Bohužel z doposud studovaných AmA byla zajímavější aktivita zjištěna pouze u tazettinu, ale ani ten nedosahoval aktivity indometacinu, který byl použit, jako standard^{19,213}. V současné době jsou na našem pracovišti připravovány deriváty tohoto alkaloidu s cílem podrobit je screeningové studii vůči různým aldoketoreduktasám (např. AKR1A1, AKR1A10, AKR1B1, AKR1B10 a dalším).

V literatuře je uváděna i zajímavá antimalarická aktivita některých AmA a jejich derivátů^{140,144,172-176}. Z těchto důvodů bylo pro Erasmus+ stáž vybráno pracoviště (MPrudêncioLab, Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes v Lisabonu), které se studiem malárie a její léčby zabývá. Byla studována aktivita AmA dříve izolovaných na našem pracovišti a jejich polosyntetických derivátů vůči jaternímu stadiu malárie způsobené *Plasmodium berghei* (malárie přenosná na myši) *in vitro* na buněčné linii lidského hepatomu HuH-7. Bohužel žádný z AmA nevykázal výraznou aktivitu srovnatelnou s literaturou, což je pravděpodobně způsobeno tím, že v literatuře jsou popsány aktivity AmA pouze vůči krevnímu stadiu různých kmenů *P. falciparum*, ale jaterní stadium není prozatím intenzivněji studováno. Rozhodně je zajímavým terapeutickým cílem vzhledem k tomu, že by znamenalo včasnější zásah v léčbě malárie.

α -Krininový alkaloid ambellin byl na základě předchozí studie na krevním stadiu *P. falciparum* považován za látku aktivní²²⁰, ale v rámci screeningové studie na jaterním stadiu vyšla jeho antimalarická aktivita spíše nezajímavá. Na druhou stranu, deriváty připravené na našem pracovišti vykázaly slibnou antimalarickou aktivitu. Jednalo se o aromatické estery ambellinu s různými substitucemi na aromatickém jádře⁷⁸. Nejzajímavější aktivitu vykázal derivát s označením LC-104 ($IC_{50} = 0,048 \pm 0,014 \mu\text{M}$). Přesnou strukturu není možné v současné době uvést, vzhledem k plánované patentové přihlášce v rámci programu InoMed. V současné době probíhá testování vybraných derivátů, které vykázaly aktivitu vůči jaternímu stadiu, na inhibici krevního stadia *Plasmodium falciparum*.

Závěrem lze konstatovat, že rostliny rodu *Narcissus* L. jsou bohatým zdrojem AmA různých strukturních typů, které disponují širokým spektrem biologických aktivit. Vzhledem k dostupnosti a ceně kultivarů rodu *Narcissus* L. je možné některé alkaloidy snadno izolovat v množstvích, která jednak umožňují podrobné biologické studie a na druhou stranu i přípravu polosyntetických za účelem rozšíření portfolia studovaných látek.

7 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: **Mgr. Kateřina Breiterová**

Školitel: **doc. Ing. Lucie Cahlíková PhD.**

Název disertační práce: **Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění**

Klíčová slova: alkaloidy, Amaryllidaceae, analoga, AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , progresse buněčného cyklu, apoptóza

Narcissus cv. Professor Einstein byl na základě získaných výsledků screeningových studií vybrán pro podrobnou fytochemickou práci za účelem co nejširšího spektra AmA. Z 34,3 kg čerstvých cibulí bylo získáno 31,7 g přečištěného alkaloidního extraktu, který byl rozdělen pomocí sloupcové chromatografie se stupňovitou elucí benzinem, chloroformem a ethanolem v různých poměrech na téměř 500 frakcí. Tyto frakce byly spojeny do 27 podfrakcí, z nichž bylo pomocí preparativní TLC, vakuové sloupcové chromatografie a krystalizace izolováno 25 alkaloidů v čistém stavu. Všechny látky byly identifikovány pomocí GC-MS, ESI-MS, NMR, optické otáčivosti a literatury a jedna z nich byla identifikována jako nový nepopsaný alkaloid lykorinového strukturního typu.

Všechny alkaloidy izolované v dostatečném množství byly podrobeny testům jejich biologické aktivity spojené s Alzheimerovou chorobou (inhibice *h*AChE, *h*BuChE, POP, GSK-3 β), cytotoxicitou, inhibicí AKR1C3 a inhibicí jaterního stadia malárie *in vitro*.

Inhibice erytrocytární *h*AChE a sérové *h*BuChE byla stanovena pomocí modifikované Ellmanovy metody. Kromě aktivity galanthaminu vůči *h*AChE byly všechny testované látky neaktivní. Stanovení inhibice vůči POP bylo provedeno spektrofotometricky a čtyři látky vykazaly aktivitu analogickou s použitým standardem berberinem ($IC_{50} = 142 \pm 21 \mu M$) a to homolykorin ($IC_{50} = 173 \pm 41 \mu M$), norlykoramin ($IC_{50} = 209 \pm 14 \mu M$), eugenin ($IC_{50} = 130 \pm 8 \mu M$) a norpluviin ($IC_{50} = 148 \pm 10 \mu M$). Tyto látky patří mezi nejúčinnější inhibitory POP z prozatím testovaných Amaryllidaceae alkaloidů. Alkaloidy masonin, karanin a 9-*O*-demethylhomolykorin vykazaly zajímavou inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β za využití luminiscenční metody.

Velká část izolovaných alkaloidů byla podrobena screeningu na devíti nádorových (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2) a dvou zdravých

(MRC-5 a NHDF) buněčných liniích. Z tohoto screeningu haemanthamin, lykorin a pankracin postoupily do stanovení IC_{50} na vybraných liniích. Haemanthamin a lykorin jsou pro své cytotoxické účinky známy, u pankracinu nebyly doposud popsány. Tato látka byla vybrána pro podrobné studie za účelem objasnění mechanismu účinku, a proto byla podrobena podrobné studii zásahu do buněčného cyklu a indukce apoptózy.

Některé z izolovaných látek byly podrobeny screeningu inhibiční aktivity vůči AKR1C3, ale žádná z nich nevykázala významnou aktivitu.

Alkaloidy byly také testovány na aktivitu vůči jaternímu stadiu malárie *in vitro*. Zde žádný z alkaloidů nevykázal význačnou aktivitu, tu vykazaly polosyntetické deriváty ambellinu – nejaktivnější byla látka s označením LC-104 ($IC_{50} = 0,048 \pm 0,014 \mu\text{M}$).

8 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: **Mgr. Kateřina Breiterová**

Supervisor: **Assoc. prof. Ing. Lucie Cahlíková PhD.**

Title of Doctoral Thesis: **Alkaloids of the Amaryllidaceae family as potential drugs in therapy of diseases of affluence**

Key words: alkaloids, Amaryllidaceae, analogues, AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , cell cycle progression, apoptosis

Narcissus cv. Professor Einstein was chosen based on results of previous screening studies for detailed phytochemical work for the purpose of isolation of the widest range of AmA. From 34,3 kg of fresh bulbs was obtained 31,7 g of purified alkaloidal extract, which was processed using column chromatography with stepwise elution by light petrol, chloroform and ethanol in different ratios to almost 500 fractions. These fractions were fused into 27 subfractions, which were processed by preparative TLC, vacuum column chromatography and crystallization. Finally, 25 pure alkaloids were isolated. All compounds were identified by GC-MS, ESI-MS, NMR, optical rotation and literature. One compound was identified as a new unpublished alkaloid of lycorine structure type.

All alkaloids isolated in sufficient amount were tested for their biological activities associated with Alzheimer's disease (inhibition of *h*AChE, *h*BuChE, POP, GSK-3 β), cytotoxicity, AKR1C3 inhibition and activity against the liver stage malaria *in vitro*.

Inhibition of erythrocytic *h*AChE and serum *h*BuChE was determined by modified Ellman's method. Except the galanthamine activity against *h*AChE were all other tested compounds considered inactive. Determination of POP inhibition was performed by spectrophotometric method and four compounds showed activity comparable to used standard berberine ($IC_{50} = 142 \pm 21 \mu M$): homolycorine ($IC_{50} = 173 \pm 41 \mu M$), norlycoramine ($IC_{50} = 209 \pm 14 \mu M$), eugenie ($IC_{50} = 130 \pm 8 \mu M$) and norpluviine ($IC_{50} = 148 \pm 10 \mu M$). These compounds belong to the most potent POP inhibitors from the currently tested Amaryllidaceae alkaloids. Alkaloids masonine, caranine and 9-*O*-demethylhomolycorine showed interesting inhibition activity against GSK-3 β in the determination by luminescent method.

Majority of isolated alkaloids went through the screening of cytotoxic activity on nine cancer (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2) and two

healthy (MRC-5 a NHDF) cell lines. From this screening haemanthamine, lycorine and pancracine advanced to the IC_{50} determination in chosen cell lines. Haemanthamine and lycorine are well known because of their cytotoxic effect but in pancracine it was not previously described. This compound was chosen for detailed study because of elucidation of its mechanism of action. Hence, pancracine went through study of the cell cycle and apoptosis induction interference.

Some of isolated compounds were screened for inhibition activity against AKR1C3 enzyme, but none of them showed any significant activity.

Alkaloids were also tested for their activity against liver stage malaria *in vitro*. Here, none of the alkaloids showed notable activity. That was showed by semisynthetic derivatives of ambelline – the most active compound was the one labeled as LC-104 ($IC_{50} = 0,048 \pm 0,014 \mu\text{M}$).

9 PŘEHLED PUBLIKACÍ A STÁŽÍ

9.1 Původní práce

Chlebek J., Doskočil I., Hulcová D., Breiterová K., Šafratová M., Havelek R., Habartová K., Hošťálková A., Volšátová T., Cahlíková L. (2016) Cytotoxicity of Naturally Occurring Isoquinoline Alkaloids of Different Structural Types. *Natural Product Communications*, 11, 753-756. (IF=0.884)

Hulcová D., Breiterová K., Zemanová L., Šafratová M., Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L. (2017) Screening of AKR1C3 inhibitory potency of naturally occurring Amaryllidaceae alkaloids of different structural types. *Natural Product Communications*, 12, 245-246. (IF=0.884)

Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L. (2018) Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*, 41, 208-218. (IF=2.242)

Breiterová K., Ločárek M., Kohelová E., Talácková M., Hulcová D., Opletal L., Cahlíková L. (2018) Daffodils as Potential Crops of Biologically-active Compounds: Assessment of 40 Ornamental Taxa for their Alkaloid Profile and Cholinesterases Inhibition Activity. *Natural Product Communications*, 13, 419-422. (IF=0.884)

Hulcová D., Breiterová K., Klímová K., Šafratová M., Hošťálková A., Simone A. de, Andrisano V., Davani L., Opletal L., Cahlíková L. (2018) Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Molecules*, 23. (IF=3.098)

Breiterová K., Maříková J., Korábečný J., Martinez-Gonzalez L., Hošťálková A., Kučera T., Perez I. D., Jun D., Kuneš J., Hulcová D., Opletal L., de Simone A., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* cv. Professor Einstein, and their semisynthetic derivatives as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. V přípravě.

9.2 Konference

9.2.1 Přednášky

Breiterová K., Siatka T., Novák Z., Hrabínová M., Cahlíková L.: Alkaloidy a biologická aktivita vybraných druhů rodů *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus*. Book of abstracts, XXII. Studentská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, Česká republika, 2014.

Breiterová K., Siatka T., Novák Z., Hrabínová M., Cahlíková L.: Alkaloidy vybraných druhů rodů *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus* a jejich biologická aktivita. Book of abstracts, XXIII. Studentská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, Česká republika, 2015.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Cahlíková L.: Alkaloids From *Narcissus* cv. Professor Einstein (Amaryllidaceae) – Isolation And Biological Activity. Book of abstracts, 6. Postgraduální a 4. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2016.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Cahlíková L.: Alkaloids From *Narcissus* cv. Professor Einstein (Amaryllidaceae) – Isolation And Biological Activity. Book of abstracts, Trends in Natural Products Research: A Young Scientists Meeting of PSE and IUNG-PIB, Pulawy, Polsko, 2016. (zisk The Teva Award for Best Oral Presentation)

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Cahlíková L.: Alkaloids From *Narcissus* cv. Professor Einstein (Amaryllidaceae) – Isolation And Biological Activity. Book of abstracts, 7. Postgraduální a 5. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2017.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Maříková J., Cahlíková L.: Amaryllidaceae Alkaloids As Potential Drugs In Diseases Of Affluence Treatment. Book of abstracts, Synthesis and analysis of drugs conference, Brno, Česká republika, 2018.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Koutová D., Maříková J., Cahlíková L.: New isomer of Pancracine as a potential anticancer agent. Book of abstracts, 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products & 10th International Congress on Biodiversity, Athény, Řecko, 2018.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Koutová D., Maříková J., Cahlíková L.: Brunsvigine Isomer As A Potential Agent In The Treatment Of Oncological Diseases. Book of abstracts, 9.

Postgraduální a 7. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2019.

9.2.2 Flash posters

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Cahlíková L.: Isolation And Biological Activities Of Alkaloids From *Narcissus* cv. Professor Einstein. Book of abstracts, 4th Meeting on Biotechnology of Plant Products, Green for Good IV – G4G, Olomouc, Česká republika, 2017.

9.2.3 Postery

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Cahlíková L.: Alkaloids From *Narcissus* cv. Professor Einstein (Amaryllidaceae) – Isolation And Biological Activity. Book of abstracts, 45. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové Česká republika, 2016.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Cahlíková L.: Isolation And Biological Activities Of Alkaloids From *Narcissus* cv. Professor Einstein. Book of abstracts, PSE Young Scientists' Meeting: Natural Products in Health, Agro-Food and Cosmetics, Lille, Francie, 2017.

Breiterová K., Hošťálková A., Opletal L., Maříková J., Cahlíková L.: Amaryllidaceae Alkaloids As Potential Drugs In Diseases Of Affluence Treatment. Book of abstracts, 47th Synthesis and analysis of drugs conference, Brno, Česká republika, 2018.

9.3 Stáž

Šestiměsíční stáž v Miguel Prudêncio Lab, Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes v Lisabonu, Portugalsko, 2. 1. – 30. 6. 2018.

Laboratoř se zabývá širokým okruhem témat spojených s infekcí *Plasmodium spp.* a antimalarickými opatřeními, jakým je i vývoj vakcíny. V rámci stáže byla testována inhibiční aktivita Amaryllidaceae alkaloidů, jejich derivátů a isochinolinových alkaloidů vůči jaternímu stadiu malárie způsobeným srozoity *Plasmodium berghei*.

Stáž proběhla v rámci programu Erasmus+.

9.4 Účelová finanční podpora

Kohelová E., Cahlíková L., Havelek R., Koutová D., Breiterová K., Maříková J.: Studium cytotoxické aktivity alkaloidů *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) a jejich polosyntetických derivátů, Study of cytotoxic activity of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) alkaloids and their semisynthetic analogues. GA UK, č. projektu 178518.

10 LITERATURA

1. Kornienko A., Evidente A. (2008) Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. *Chemical Reviews*. **108**, 1982-2014.
2. Sumner J. (2000) *The natural history of medicinal plants*. Portland: Timber Press. ISBN 978-0-88192-483-1.
3. Newman D. J., Cragg G. M. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. **79**, 629-661.
4. Cragg G. M., Newman D. J., Snader K. M. (1997) Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*. **60**, 52-60.
5. Kinghorn A. D. (2001) Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **53**, 135-148.
6. Opletal L. (2013) Prolegomenon české farmakognozie: 21. století. *Česká a Slovenská Farmacie*, **62**, 99-102.
7. Noncommunicable diseases. *World Health Organization* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.
8. Prüss-Ustün A., van Deventer E., Mudu P., Campbell-Lendrum D., Vickers C., Ivanov I., Forastiere F., Gumy S., Dora C., Adair-Rohani H., Neira M. (2019) Environmental risks and non-communicable diseases. *BMJ: British Medical Journal*. **364**. DOI: 10.1136/bmj.l265.
9. *Angiosperm Phylogeny Website* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
10. Berkov S., Codina C., Bastida J. (2012) The Genus *Galanthus*: A Source of Bioactive Compounds. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech, 235-254. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-genus-galanthus-a-source-of-bioactive-compounds>.
11. Zhong J. (2005) Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Natural Product Reports*. **22**. DOI: 10.1039/b316106b.
12. Szlávik L., Gyuris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J. (2004) Alkaloids from *Leucojum vernum* and Antiretroviral Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 871-873.
13. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. (2013) Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, **107**, 701-708.
14. Harvey A. L. (1995) The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogues. *Pharmacology & Therapeutics*, **68**, 113-128.
15. Elgorashi E. E., Stafford G. I., van Staden J. (2004) Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*, **70**, 260-262.
16. Takos A., Rook F. (2013) Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 11713-11741.

17. Hänsel R., Sticher O. (2004) *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. ISBN 3-540-01024-6.
18. Steglich W., Fugmann B., Lang-Fugmann S., eds. (2000) *RÖMPP Encyclopedia: Natural Products*. Stuttgart: Georgh Thieme Verlag,. ISBN 3-13-117711-X.
19. Šafratová, M. (2016) Studium inhibičního (toxického) vlivu alkaloidů vybraných druhů rostlin z čeledi Amaryllidaceae na některé lidské enzymové systémy (*in vitro* studie) III. Hradec Králové. Doktorská disertační práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova.
20. Hulcová D. (2018) Biologická aktivita alkaloidů *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae). Hradec Králové. Doktorská disertační práce. Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova.
21. Berkov S., Martínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S. (2014) Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. **99**, 95-106.
22. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F. (2011) 3. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. Muñoz-Torrero D. ed.: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Kerala: Transworld Research Network, 65-100. ISBN 978-81-7895-528-5.
23. Kington S. (2008) *The International Daffodil Register and Classified List*. Royal Horticultural Society, London.
24. Burnie G. (2007) *Botanika: ilustrovaný abecední atlas 10 000 zahradních rostlin s návodem, jak je pěstovat*. Praha: Slovart. ISBN 978-80-7209-936-8.
25. *Missouri Botanical Garden* [online]. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.missouri-botanicalgarden.org/>.
26. Vaněk V., Ondrušková L., Petrová E., Václavík J. (1974) Tulipány, narcisy, hyacinty. SZN, Praha.
27. *Narcissus Large Cupped Professor Einstein*. In: *Longfield Gardens* [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <http://www.longfield-gardens.com/plantname/Narcissus-Professor-Einstein>
28. *Professor Einstein Daffodil Bulbs. Ty Ty Nursery* [online]. [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://www.tytyga.com/Professor-Einstein-Daffodil-p/daffodil-professor-einstein.htm>.
29. Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L. (2018) Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*, **41**, 208-218.
30. Hanks G. R. (2002) *Narcissus and daffodil: the genus narcissus*. New York: Taylor & Francis. ISBN 0415273447.
31. Zhong J. (2009) Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Products Reports*. **26**, 363-381.
32. *World Alzheimer Report 2018: The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*. (2018) Alzheimer's Disease International.
33. Francis P. T., Palmer A. M., Snape M., Wilcock G. K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **66**, 137-147.

34. Laws K. R., Irvine K., Gale T. M. (2018) Sex differences in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Psychiatry*, **31**, 133-139.
35. Seven Stages of Alzheimer's. In: *Alzheimer's Association* [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp.
36. Tan S. H., Karri V., Tay N. W. R., Chang K. H., Ah H. Y., Ng P. Q., Ho H. S., Keh H. W., Candasamy M. (2019) Emerging pathways to neurodegeneration: Dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **111**, 765-777.
37. Koukolík F., Jiráček R. (1998) *Alzheimerova nemoc a další demence*. 1. vydání, Praha: Grada Publishing. ISBN 80-7169-615-3.
38. Norstrom E. (2017) Metabolic Processing of the Amyloid Precursor Protein - New Pieces of the Alzheimer's Puzzle. *Discovery Medicine*. **23**, 269-276.
39. Soba P., Eggert S., Wagner K., Zentgraf H., Siehl K., Kreger S., Löwer A., Langer A., Merdes G., Paro R., Masters C. L., Müller U., Kins S., Beyreuther K. (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *The EMBO Journal*. **24**, 3624-3634.
40. Deyts C., Thinakaran G., Parent A. T. (2016) APP Receptor? To Be or Not To Be. *Trends in Pharmacological Sciences*. **37**, 390-411
41. Zheng H., Koo E. H. (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Molecular Neurodegeneration*. **6**. DOI: 10.1186/1750-1326-6-27.
42. Lichtenthaler S. F. (2012) Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Current Alzheimer Research*. **9**, 165-177.
43. Wolfe M.S., De Los Angeles J., Miller D. D., Xia W., Selkoe D. J. (1999) Are Presenilins Intramembrane-Cleaving Proteases? Implications for the Molecular Mechanism of Alzheimer's Disease. *Biochemistry*. **38**, 11223-11230.
44. Chasseigneaux, S., Allinquant B. (2012) Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of Neurochemistry*. **120**, 99-108.
45. Masters, C. L., Selkoe D. J. (2012) Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **2**, 1-25. DOI: 10.1101/cshperspect.a006262.
46. De Strooper B., Chávez Gutiérrez L. (2015) Learning by Failing: Ideas and Concepts to Tackle γ -Secretases in Alzheimer's Disease and Beyond. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **55**(1), 419-437.
47. Baranger K., Bonnet A. E., Girard S. D., Paumier J-M., García-González L., Elmanaa W., Bernard A., Charrat E., Stephan D., Bauer Ch., Moschke K., Lichtenthaler S. F., Roman F. S., Checler F., Khrestchatsky M., Rivera S. (2016) MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in vitro. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. **9**. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00163.
48. Matsui T., Ingelsson M., Fukumoto H., Ramasamy K., Kowa H., Frosch M. P., Irizarry M. C., Hyman B. T. (2007) Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Research*. **1161**, 116-123.
49. Willem M., Tahirovic S., Busche M. A., Ovsepian S. V., Chafai M., Kootar S., Hornburg D., Evans L. D. B., Moore S., Daria A., Hampel H., Müller V., Giudici C., Nuscher B.,

- Wenninger-Weinzierl A., Kremmer E., Heneka M. T., Thal D. R., Giedraitis V., Lannfelt L., Müller U., Livesey F. J., Meissner F., Herms J., Konnerth A., Marie H., Haass Ch. (2015) η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*. **526**, 443-447.
50. Zhang Z., Song M., Liu X., Su Kang S., Duong D. M., Seyfried N. T., Cao X., Cheng L., Sun Y. E., Ping Yu S., Jia J., Levey A. I., Ye K. (2015) Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature Communications*. **6**. DOI: 10.1038/ncomms9762.
 51. Sun X., He G., Song W. (2006) BACE2, as a novel APP θ -secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *The FASEB Journal*. **20**, 1369-1376.
 52. Liu B., Hong J. S. (2003) Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **304**, 1-7. DOI: 10.1124/jpet.102.035048.
 53. Standridge J. (2006) Vicious Cycles Within the Neuropathophysiologic Mechanisms of Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*. **3**, 95-107.
 54. Cai Z., Hussain M. D., Yan L-J. (2013) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*. **124**, 307-321.
 55. Yan S., Chen X., Walker D., Schmidt A., Arancio O., Lue L-F. (2007) RAGE: A Potential Target for A β -Mediated Cellular Perturbation in Alzheimers Disease. *Current Molecular Medicine*. **7**, 735-742.
 56. Lansdall C. J. (2014) An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. *Bioscience Horizons*. **7**. DOI: 10.1093/biohorizons/hzu002.
 57. Arbor, S. (2017) Targeting amyloid precursor protein shuttling and processing - long before amyloid beta formation. *Neural Regeneration Research*. **12**. DOI: 10.4103/1673-5374.200800.
 58. *ClinicalTrials* [online]. [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/>.
 59. Hardy J., Selkoe D. J. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*. **297**, 353-356.
 60. Braak H., Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*. **82**, 239-259.
 61. Ferrari A., Hoerndli F., Baechi T., Nitsch R. M., Götz J. (2003) β -Amyloid Induces Paired Helical Filament-like Tau Filaments in Tissue Culture. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 40162-40168.
 62. Finder V. H. (2010) Alzheimer's Disease: A General Introduction and Pathomechanism. *Journal of Alzheimer's Disease*. **22**, 5-19.
 63. Saraswati A. P., Ali Hussaini S. M., Krishna N. H., Babu B. N., Kamal A. (2018) Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: Potential target for various therapeutic conditions. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **144**, 843-858.
 64. Luo J. (2009) Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Letters*. **273**, 194-200.

65. Henriksen E., Dokken B. (2006) Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Current Drug Targets*. **7**, 1435-1441.
66. Iqbal K., del C. Alonso A., Chen S., Chohan M. O., El-Akkad E., Gong C-X., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1739**, 198-210.
67. New Biomarker for Alzheimer's Disease Diagnostic (BALTAZAR). *ClinicalTrials* [online]. [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01315639?term=tau+protein&recrs=d&cond=Alzheimer+Disease&rank=1>.
68. Duron E., Vidal J-S., Grousselle D., Gabelle A., Lehmann S., Pasquier F., Bombois S., Buée L., Allinquant B., Schraen-Maschke S., Baret Ch., Rigaud A-S., Hanon O., Epelbaum J. (2018) Somatostatin and Neuropeptide Y in Cerebrospinal Fluid: Correlations With Amyloid Peptides A β 1–42 and Tau Proteins in Elderly Patients With Mild Cognitive Impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience*. **10**. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00297.
69. Tau proteins. *SignalChem* [online]. [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: https://www.signalchem.com/product_details_template_tauprotein.php?id=60.
70. Drachman D. A. (1974) Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? *Archives of Neurology*. **30**, 113-121.
71. Davies P., Maloney A. J. F. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. **2**, 1403.
72. Rylett R.J., Ball M.J., Colhoun E.H. (1983) Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Research*. **289**, 169-175.
73. Nilsson L., Nordberg A., Hardy J. A., Wester P., Winblad B. (1986) Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *Journal of Neural Transmission*. **67**, 275-285.
74. Wilcock G. K., Esiri M. M., Bowen D. M., Smith C. C. T. (1982) Alzheimer's disease: Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *Journal of the Neurological Sciences*. **57**, 407-417.
75. Gupta R. C., ed. (2015) *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*. 2. vydání, Boston: Elsevier/AP, ISBN 978-0-12-800159-2.
76. Greig N. H., Lahiri D. K., Sambamurti K. (2002) Butyrylcholinesterase: An Important New Target in Alzheimer's Disease Therapy. *International Psychogeriatrics*. **14**, 77-91.
77. Exelon. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0026533>.
78. Maříková J., Ritomská A., Korábečný J., Peřinová R., Al Mamun A., Kučera T., Hulcová D., Kuneš J., Cahlíková L. Aromatic esters of α -crinine Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of Natural Products*, v revizi.
79. D'Souza G. X., Waldvogel H. J. (2016) Targeting the Cholinergic System to Develop a Novel Therapy for Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease*. **5**, 333-342.
80. Wang R., Reddy P. H. (2017) Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **57**, 1041-1048.

81. Parsons M. P., Raymond L. A. (2014) Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders. *Neuron*. **82**, 279-293.
82. Rothman S. M., Olney J. W. (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends in Neurosciences*. **10**, 299-302.
83. Jiráček R. (2004) Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie*, **18**, 212-214.
84. Petrovič M, Sedláček M, Horák M, Vyklický L. (2004) Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klinická farmakologie a farmacie*, **18**, 81-89.
85. Langmeier M. et al. (2009) *Základy lékařské fyziologie*. Grada, Praha, ISBN 9788024725260.
86. Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database. *VIB Center for Molecular Neurology* [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://www.molgen.ua.ac.be/Admutations/default.cfm?MT=0&ML=1&Page=AD>.
87. Shea Y.-F., Chu L.-W., Chan A. O.-K., Ha J., Li Y., Song Y.-Q. (2016) A systematic review of familial Alzheimer's disease: Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences. *Journal of the Formosan Medical Association*. **115**, 67-75.
88. Shen J., Kelleher R. J. (2007) The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: Evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**, 403-409.
89. O'Brien R. J., Wong P. C. (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience*. **34**, 185-204.
90. *APP* [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APP>.
91. Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database. *VIB Center for Molecular Neurology* [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://www.uantwerpen.vib.be/ADMutations/default.cfm?MT=0&ML=2&Page=FTD>.
92. Dacks P.: What ApoE means for your health. *Alzheimer's Drug Discovery Foundation* [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://www.alzdiscovery.org/cognitive-vitality/blog/what-apoe-means-for-your-health>.
93. Myhre O., Utkilen H., Duale N., Brunborg G., Hofer T. (2013) Metal Dyshomeostasis and Inflammation in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Possible Impact of Environmental Exposures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2013**, 1-19. DOI: 10.1155/2013/726954.
94. Mutter J., Naumann J., Schneider R., Walach H. (2007) Quecksilber und Alzheimer-Erkrankung. *Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie*. **75**, 528-538.
95. Aizenman E., Mastroberardino P. G. (2015) Metals and neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*. **81**, 1-3. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.08.012.
96. van den Heuvel C., Thornton E., Vink R. (2007) Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Neurotrauma: New Insights into Pathology and Treatment*. **161**, 303-316.

97. Moreira P. I., Carvalho C., Zhu X., Smith M. A., Perry G. (2010) Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1802**, 2-10.
98. Kim G. H., Kim J. E., Rhie S. J., Yoon S. (2015) The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*. **24**. DOI: 10.5607/en.2015.24.4.325.
99. Piersol C. V., Jensen L., Lieberman D., Arbesman M. (2018) Occupational Therapy Interventions for People With Alzheimer's Disease. *American Journal of Occupational Therapy*. **72**. DOI: 10.5014/ajot.2018.721001.
100. Rössner P. (2004) Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, **5**, 11-16.
101. Hsu W.-Y., Lane H-Y., Lin Ch-H. (2018) Medications Used for Cognitive Enhancement in Patients With Schizophrenia, Bipolar Disorder, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease. *Frontiers in Psychiatry*. **9**. DOI: 10.3389/fpsy.2018.00091.
102. Galantamin Mylan. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0236028&tab=info>.
103. Krejčová G., Ševelová L. (2003) Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy*, **72**, 37-44.
104. Pidrman V., Látalová K., Chroust K. (2006) Účinnost a snášenlivost galantaminu v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, **7**, 276-281.
105. Donepezil. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0142187>.
106. Mamikonyan E., Xie S. X., Melvin E., Weintraub D. (2015) Rivastigmine for mild cognitive impairment in Parkinson disease: A placebo-controlled study. *Movement Disorders*. **30**, 912-918.
107. Li Z., Yu Z., Zhang J., Wang J., Sun Ch., Wang P., Zhang J. (2015) Impact of Rivastigmine on Cognitive Dysfunction and Falling in Parkinson's Disease Patients. *European Neurology*. **74**, 86-91.
108. Ebixa. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0026502>.
109. Martín J., Kršková Z., Dušek J. (2011) Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, **7**, 39-41.
110. Drtinová L., Pohanka M. (2013) Možnosti využití Huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chemické listy*, **107**, 12-15.
111. *U.S Food & Drug Administration* [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/>
112. *Pharmazeutische Stoffliste: 21. Auflage*. (2018) 21. vydání, ABData, ISSN 1865-5777.
113. Yang X.-W., Zhang H., Li M., Du L.-J., Yang Z., Xiao S.-Y. (2006) Studies on the alkaloid constituents of *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth var. *bodinaieri* (Dode) Huang and their acute toxicity in mice. *Journal of Asian Natural Products Research*. **8**, 697-703.
114. Wang B., Mai Y.-Ch., Li Y., Hou J.-Q., Huang S.-L., Ou T.-M., Tan J.-H., An L.-K., L. D., Gu L.-Q. (2010) Synthesis and evaluation of novel rutaecarpine derivatives and related

- alkaloids derivatives as selective acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **45**, 1415-1423.
115. Šafratová M., Novák Z., Kulhánková A., Kuneš J., Hrabínová M., Jun D., Macáková K., Opletal L., Cahlíková L. (2013) Revised NMR data for 9-*O*-demethylgalanthine: an Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its Biological Activity. *Natural Product Communications*, **8**, 1-2.
 116. Jahodář L. (2009) *Farmakobotanika: semenné rostliny*. 2. vydání Praha: Karolinum, ISBN 9788024617916.
 117. Marco L., do Carmo Carreiras M. (2006) Galanthamine, a Natural Product for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **1**, 105-111.
 118. Bal G., Van der Veken P., Antonov D., Lambeir A.-M., Grellier P., Croft S. L., Augustyns K., Haemers A. (2003) Prolylisoxazoles: potent inhibitors of prolyloligopeptidase with antitrypanosomal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 2875-2878.
 119. Jiráček R. (2009) Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencií. *Neurologie pro praxi*, **10**, 384-389.
 120. Lin Ch-H., Chen P-K., Chang Y-C., Chuo L-J., Chen Y-S., Tsai G. E., Lane H-Y. (2014) Benzoate, a D-Amino Acid Oxidase Inhibitor, for the Treatment of Early-Phase Alzheimer Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Biological Psychiatry*. **75**, 678-685.
 121. Benfotiamine in Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *ClinicalTrials* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02292238?term=NCT+02292238&rank=1>.
 122. All cancers. In: *Global Cancer Observatory: Cancer Today* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
 123. Huether S. E., McCance K. L. (2012) *Understanding pathophysiology*. 5. vydání. St. Louis: Elsevier. ISBN 978-0-323-07891-7.
 124. Mendelsohn J. (2015) *The molecular basis of cancer*. 4. vydání. Philadelphia: Elsevier. ISBN 978-145-5740-666.
 125. Alberts B. (1998) *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Přeložili Kotyk A., Bouzek B., Hozák P. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-2-0.
 126. *Global Cancer Observatory: Cancer Today* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
 127. Klener P., Klener P. jr. (2013) Léky přírodního původu a jejich potenciální protinádorový účinek. *Onkologie*. **7**(1), 47-50.
 128. Taxol. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0050083>.
 129. Docetaxel Accord. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0193327&tab=texts>.
 130. Vincristine Teva. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0011420&tab=texts>.
 131. Vinblastine Teva. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0129597&tab=texts>.

132. Etoposid Ebewe. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0012670&tab=texts>.
133. Hycamtin. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0025622&tab=texts>.
134. Irinotecan Mylan. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0130137&tab=texts4>.
135. Havelek R., Muthna D., Tomsik P., Kralovec K., Seifrtova M., Cahlíková L., Hostalkova A., Safratova M., Perwein M., Cermakova E., Rezacova M. (2017) Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions*. **275**, 121-132.
136. Zupkó I., Réthy B., Hohmann J., Molnár J., Ocsovszki I., Falkay G. (2009) Antitumor Activity of Alkaloids Derived from Amaryllidaceae Species. *In vivo*. **23**, 41-48.
137. Weniger B., Italiano L., Beck J.-P., Bastida J., Bergoñon S., Codina C., Lobstein A., Anton R. (1995) Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*. **61**, 77-79.
138. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L. (2015) Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*. **13**, 394-398.
139. Kretzing S., Abraham G., Seiwert B., Ungemach F. R., Krügel U., Regenthal R. (2011) Dose-dependent emetic effects of the Amaryllidaceous alkaloid lycorine in beagle dogs. *Toxicol.* **57**, 117-124.
140. Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á.G., Estévez-Braun A. (2010) Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **18**, 4694-4701.
141. Lamoral-Theys D., Decaestecker C., Mathieu V., Dubois J., Kornienko A., Kiss R., Evidente A., Pottier L. (2010) Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **10**, 41-50.
142. McNulty J., Nair J. J., Bastida J., Pandey S., Griffin C. (2009) Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry*. **70**, 913-919.
143. Roy M., Liang L., Xiao X., Feng P., Ye M., Liu J. (2018) Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Journal of Biomedicine and Pharmacotherapy*. **107**, 615-624.
144. Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á.G., Estévez-Braun A. (2012) Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **20**, 5464-5472.
145. Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., Havelek R. (2016) The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Natural Product Communications*. **11**, 1-8.
146. Hroch M., Mičuda S., Havelek R., Cermanová J., Cahlíková L., Hošťálková A., Hulcová D., Řezáčová M. (2016) LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. **30**, 1083-1091.

147. Fürst R. (2016) Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica*. **82**, 1389-1394.
148. Ma D., Pignanelli Ch., Tarade D., Gilbert T., Noel M., Mansour F., Adams S., Dowhayko A., Stokes K., Vshyvenko S., Hudlicky T., McNulty J., Pandey S. (2017) Cancer Cell Mitochondria Targeting by Pancratistatin Analogs is Dependent on Functional Complex II and III. *Scientific Reports*. **7**. DOI: 10.1038/srep42957.
149. Perkins S. L. (2014) Malaria's Many Mates: Past, Present, and Future of the Systematics of the Order Haemosporida. *Journal of Parasitology*. **100**, 11-25.
150. Ashley E. A., Pyae Phyo A., Woodrow Ch. J. (2018) Malaria. *Lancet*. **391**, 1608-1621.
151. World Health Organization. (1997) World malaria situation in 1994. Parts I - III. *Weekly Epidemiological Record*. **72**, 269-90.
152. *World Malaria Report 2018*. Luxembourg: World Health Organization, 2018. ISBN 978-92-4-156565-3.
153. Anopheles Mosquito. *Orkin* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.orkin.com/other/mosquitoes/anopheles-mosquito>
154. Malaria. Vector Disease Control International [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <http://www.vdci.net/vector-borne-diseases/malaria-education-and-integrated-mosquito-management-to-protect-public-health>.
155. *RBM Partnership: To End Malaria* [online]. 2019 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://endmalaria.org/about-us>.
156. Suh K. N., Kain K. C., Keystone J. S. (2004) Malaria. *Canadian Medical Association Journal*. **170**, 1693-1702.
157. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5951/figure/malaria_LifeCycle/.
158. Magill A. J. (2013) *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. 9. vydání. London: Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4160-4390-4.
159. Roshanravan B., Kari E., Gilman R. H., Cabrera L., Lee E., Metcalfe J., Caldeeron M., Lescado A. G., Montenegro S. H., Calampa C., Vinetz J. M. (2003) Endemic Malaria In The Peruvian Amazon Region Of Iquitos. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **69**, 45-52.
160. Owusu-Agyei S., Koram K. A., Baird J. K., Utz G. C., Binka F. N., Nkrumah F. K., Fryauff D. J., Hoffman S. L. (2001) Incidence Of Symptomatic And Asymptomatic Plasmodium Falciparum Infection Following Curative Therapy In Adult Residents Of Northern Ghana. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **65**, 197-203.
161. *RoPlavac* [online]. [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://www.miguelprudencio.com/roplavac>.
162. Palmer C. J., Lindo J. F., Klaskala W. I., Quesada J. A., Kaminsky R., Baum M. K., Ager A. L. (1998) Evaluation of the OptiMAL Test for Rapid Diagnosis of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**, 203-206.
163. Geneticky vylepšené bakterie brání přenosu malárie. Gate2Biotech: Vše o českých biotechnologiích na jednom místě [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/geneticky-vylepsene-bakterie-brani-prenosu-malarie/>.

164. Farcas G. A., Zhong K. J., Mazzulli T., Kain K. C. (2004) Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for Malaria Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 636-638.
165. Lampah D. A., Yeo T. W., Hardianto S. O., Tjitra E., Kenangalem E., Sugiarto P., Price R. N., Anstey N. M., Vinetz J. M. (2011) Coma Associated with Microscopy-Diagnosed *Plasmodium vivax*: A Prospective Study in Papua, Indonesia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **5**(6). DOI: 10.1371/journal.pntd.0001032.
166. Sidhu A. B. S., Verdier-Pinard D., Fidock D. A. (2002) Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by *pfcr* Mutations. *Science*. **298**, 210-213.
167. Mvumbi D. M., Bobanga T. L., Kayembe J-M. N., Mvumbi G. L., Situakibanza H. N-T., Benoit-Vical F., Melin P., De Mol P., Hayette M-P., Snounou G. (2017) Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies in the Democratic Republic of Congo. *PLoS ONE*. **12**, 1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0179142.
168. Daily J. P. (2017) Malaria 2017: Update on the Clinical Literature and Management. *Current Infectious Disease Reports*. **19**. DOI: 10.1007/s11908-017-0583-8.
169. Thu A. M., Phyo A. P., Landier J., Parker D. M., Nosten F. H. (2017) Combating multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *The FEBS Journal*. 1-10. DOI: 10.1111/febs.14127.
170. Awolola T. S., Adeogun A., Olakiigbe A. K., Oyeniyi T., Olukosi Y. A., Okoh H., Arowolo T., Akila J., Oduola A., Amajoh C. N., Qiu X. (2018) Pyrethroids resistance intensity and resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* from malaria vector surveillance sites in Nigeria. *PLoS ONE*. **13**. DOI: 10.1371/journal.pone.0205230.
171. van Dyk S., Griffiths S., van Zyl R. L., Malan S. F. (2009) The importance of including toxicity assays when screening plant extracts for antimalarial activity. *African Journal of Biotechnology*. **8**, 5595-5601.
172. Şener B., Orhan I., Satayavivad J. (2003) Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from *Amaryllidaceae*. *Phytotherapy Research*. **17**(12), 1220-1223.
173. Herrera M. R., Machocho A. K., Nair J. J., Campbell W. E., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J. (2001) Alkaloids from *Cyrtanthus elatus*. *Fitoterapia*. **72**, 444-448.
174. Toriizuka Y., Kinoshita E., Kogure N., Kitajima M., Ishiyama A., Otoguro K., Yamada H., Ōmura S., Takayama H. (2008) New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **16**, 10182-10189.
175. Labraña J., Machocho A. K., Kricsfalusy V., Brun R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. (2002) Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (*Amaryllidaceae*). *Phytochemistry*. **60**, 847-852.
176. Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á.G., Estévez-Braun A. (2013) Preparation and antimalarial activity of semisynthetic lycorenine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **63**, 722-730.
177. Skarnitzl E., ed. (1971) *Československý lékopis, díl I*, 3. vydání, Praha: Avicenum.

178. Šinko G., Čalić M., Bosak A., Kovarik Z. (2007) Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry*, **370**, 223-227.
179. Hulcová D., Breiterová K., Klímová K., Šafratová M., Hošťálková A, Simone A. de, Andrisano V., Davani L., Opletal L., Cahlíková L. (2018) Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors, *Molecules*, **23**, 1-9.
180. Ploemen I. H. J., Prudêncio M., Douradinha B. G., Ramesar J., Fonager J., van Gemert G. J., Luty A. J. F., Hermsen C. C., Sauerwein R. W., Baptista F. G., Mota M. M., Waters A. P., Que I., Lowik C. W. G. M., Khan S. M., Janse Ch. J., Franke-Fayard B. M. D. (2009) Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PLoS ONE*. 7881.
181. Havelek R., Seifrtová M., Královec K., Bručková L., Cahlíková L., Dalecká M., Vávrová J., Řezáčová M., Opletal L., Bílková Z. (2014) The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, **21**, 479-490.
182. BIOVISION, Inc. Ready-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1. *BioVision - Life Science Source* [online].[cit. 2019-3-27]. Dostupné z: <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>.
183. Kabelitz, edited by Stefan H. E., Kaufmann and Dieter. (2002) *Immunology of infection*. 2. vydání. Amsterdam: Elsevier Academic Press. ISBN 0125215320.
184. Mahto S. K., Chandra P., Rhee S. W. (2010) In vitro Models, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicology and environmental health sciences.*, **2**, 87-93.
185. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, Cañete M., Horobin R. W. A Villanueva Á. (2012) MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica: Zeitschrift für histologische Topochemie*. **114**, 785-796.
186. Breiterová K., Ločárek M., Kohelová E., Talácková M., Hulcová D., Opletal L., Cahlíková L. (2018) Daffodils as Potential Crops of Biologically-active Compounds: Assessment of 40 Ornamental Taxa for their Alkaloid Profile and Cholinesterases Inhibition Activity. *Natural Product Communications*, **13**, 419-422.
187. Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., Štěpánková Š., Novák Z., Ločárek M., Opletal L., Hrabínová M., Jun D., Benešová N., Kuneš J., Cahlíková L. (2014) Chemical Composition of Bioactive Alkaloid Extracts from Some *Narcissus* Species and Varieties and their Biological Activity. *Natural Product Communications*, **9**, 1151-1155.
188. Cahlíková L., Ločárek M., Benešová N., Kučera R., Chlebek J., Novák Z., Opletal L. (2013) Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Narcissus* Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. *Natural Product Communications*, **8**, 781-785.
189. Pigni N. B., Ríos-Ruiz S., Martíñez-Francés V., Nair J. J., Viladomat F., Codina C., Bastida J. (2012) Alkaloids from *Narcissu serotinus*. *Journal of Natural Products*, **75**, 1643-1647.
190. Huang S., Zhang Y., He H., Li S., Tang G., Chen D., Cao M., Di Y. Hao X. J. (2003) A new Amaryllidaceae alkaloid from bulbs of *Lycoris radiata*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **11**, 406-410.

191. Cowden C. J., Banwell M. G., Ho I. C. S. (1994) Synthesis Of The Putative Structure Of 5,6-Dihydrobicolorin. *Journal of Natural Products*, **57**, 1746-1750.
192. Lamoral-Theys D., Andolfi A., Van Goietsenoven G., Cimmino A., Le Calvé B., Wauthoz N., Mégalizzi V., Gras T., Bruyere C., Dubois J., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A. (2009) Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 6244-6625.
193. Roberts J. D., Crain Jr W. O., Wildman W. C. (1971) Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of nicotine, quinine, and some Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, **93**, 990-994.
194. Jegorov A., Buchta M., Sedmera P., Kuzma M., Havlíček V. (2006) Accurate product ion mass spectra of galanthamine derivatives. *Journal of Mass Spectrometry*, **41**, 544-548.
195. Lee B. K. T., Goehring K. E., Ma Z. (1998) One-step conversion of galanthamine to lycoramino: a novel hydride-transfer reaction. *Journal of Organic Chemistry*, **63**, 4535.
196. Berkov S., Reyes-Chilpa R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. (2007) Revised NMR data for incartine: an alkaloid from *Galanthus elwesii*. *Molecules*, **12**, 1430-1435.
197. Berkov S., Bastida J., Sidjimova B., Viladomat F., Codina C. (2008) Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 638-645.
198. Abou-Donia A. H., Darwish F. A., Amer M. E., Kassem F. F., Hammada H. M., Shin Y-G. (2002) Alkaloids From Narcissus cv. Ice Follies Cultivated in Egypt. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**, 96-99.
199. Bastida J., Codina C., Viladomat F., Rubialta M., Quirion J-Ch., Husson H-P., Ma G-E. (1990) Narcissus Alkaloids, Xiii. Complete Assignment of the NMR Spectra Of Papyramine and 6-Epi-Papyramine By Two-Dimensional Nmr Spectroscopy. *Journal of Natural Products*, **53**, 1456-1462.
200. Chen J., Xie J., Bao D., Liu S., Zhou Q. (2012) Total synthesis of (-)-galanthamin and (-)-lycoramin via catalytic asymmetric hydrogenation and intramolecular reductive heck cyclization. *Organic Letters*, **14**, 2714-2717.
201. Berkov S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. (2008) Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. *Phytochemical Analysis*, **19**, 285-293.
202. Bastida J., Viladomat F., Bergonon S., Fernandez J. M., Codina C., Rubialta M., Quirion J-Ch. (1993) Alkaloids From Narcissus Leonensis*. *Phytochemistry*, **34**, 1656-1658.
203. Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F. (2006) The Alkaloids: Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. Chapter 3, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Amsterdam: Elsevier, **63**, 87-179.
204. Jeffs P. W., Abou-Donia A., Campau D. (1985) Structures of 9-O-Demethylhomolycorine and 5 α -Hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum*, and *C. latifolium*. Assignment of aromatic substitution patterns from ¹H-coupled ¹³C spectra. *Journal of Organic Chemistry*, **50**, 1732-1737.
205. Ghosal S., Ashutosh Razdan S. (1985) Chemical-constituents of Amaryllidaceae.9. (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes-rosea*. *Phytochemistry*, **24**, 635-637.

206. Berkov S, Pavlov A, Ilieva M, Burrus M, Popov S, Stanilova M. (2005) CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochemical Analysis*, **16**, 98-103.
207. Berkov S, Sidjimove B, Evstatieva L, Popov S. (2004) Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, **65**, 579-586.
208. Crain W. O., Wildman W. C., Roberts J. D. (1971) Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of nicotine, quinine, and some Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, **40**, 961-965.
209. Via J., Arriortura M. I., Ochando L. E., Reventos M. M., Amigo J. M., Bastida J. (1989) Structure of Eugenine, an Alkaloid from *Narcissus eugeniae*. *Acta Crystallographica Section C*. **45**, 2020-2022.
210. Berkov S., Romani S., Herrera M., Viladomat F., Codina C., Momekov G., Ionkova I., Bastida J. (2011) Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*, **25**, 1686-1692.
211. Berkov S., Evstatieva L., Popov S. (2004) Alkaloids in Bulgarian *Pancreatium maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung*, **59C**, 65-69.
212. Bao X., Cao Y-X., Chu W-D., Qu H., Du J-Y., Zhao X-H., Ma X-Y., Wang Ch-T., Fan Ch-A. (2013) Bioinspired Total Synthesis of Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloids. *Angewandte Chemie International Edition*. **52**, 14167-14172. DOI: 10.1002/anie.201307324.
213. Vaněčková N. (2018) Study of the inhibitory (toxic) effect of the alkaloids from chosen plants of Amaryllidaceae family on some human enzymatic systems (*in vitro* study) II. Hradec Králové. *Doktorská disertační práce*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova.
214. Hulcová D., Breiterová K., Zemanová L., Šafratová M., Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L. (2017) Screening of AKR1C3 inhibitory potency of naturally occurring Amaryllidaceae alkaloids of different structural types. *Natural Product Communications*, **12**, 245-246.
215. Tarrago T., Kichik N., Seguí J., Giralt E. (2007) The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. *ChemMedChem*. **2**, 354-359. DOI: 10.1002/cmdc.200600303.
216. Sutherland C. (2011) What Are the bona fide GSK3 Substrates?. *International Journal of Alzheimer's Disease*. **2011**, 1-23. DOI: 10.4061/2011/505607
217. Hamann M., Alonso D., Martín-Aparicio E., Fuertes A., Pérez-Puerto M. J., Castro A., Morales S., Navarro M. L., del Monte-Millán M., Medina M., Pennaka H., Balaiah A., Peng J., Cook J., Wahyuono S., Martínez A. (2007) Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitory Activity and Structure–Activity Relationship (SAR) Studies of the Manzamine Alkaloids. Potential for Alzheimer’s Disease. *Journal of Natural Products*. **70**, 1397-1405. DOI: 10.1021/np060092r.
218. Meijer L., Thunnissen A-M. W. H., White A. W., Garnier M., Nikolic M., Tsai L-H., Walter J., Cleverley K. E., Salinas P. C., Wu Y-Z., Biernat J., Mandelkow E-M., Kim S-H., Pettit G. R. (2000) Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chemistry & Biology*. **7**, 51-63.
219. Männistö P. T., García-Horsman J. A. (2017) Mechanism of Action of Prolyl Oligopeptidase (PREP) in Degenerative Brain Diseases: Has Peptidase Activity Only a

Modulatory Role on the Interactions of PREP with Proteins?. *Frontiers in Aging Neuroscience*. **9**. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00027.

220. Cho N., Du Y., Valenciano A. L., Fernández-Murga M. L., Goetz M., Clement J., Cassera M. B., Kingston D. G. I. (2018) Antiplasmodial alkaloids from bulbs of *Amaryllis belladonna* Steud. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **28**, 40-42.
221. Hošťálková A., Maříková J., Opletal L., Korábečný J., Hulcová D., Kuneš J., Nováková L., Perez D.I., Jun D., Kučera T., Andrisano V., Cahliková L. (2019) Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* as potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Natural Products*. **82**, 239-248.