

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

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

Hradec Králové, 2012

Nina Benešová

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2012

.....

podpis

Děkuji grantům SVV UK 265 002, FRVŠ 664/2011 a FRVŠ 190/2012 za finanční podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Chtěla bych moc poděkovat Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za poskytnuté materiály, rady a pomoc při vypracování diplomové práce a s interpretací MS spekter, dále Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změření biologických aktivit alkaloidních extraktů a PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za změření GC/MS spekter. V neposlední řadě chci poděkovat celé Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a ochotu pomoci při řešení nejrůznějších problémů.

OBSAH

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 6 |
| 2 | CÍL PRÁCE | 8 |
| 3 | TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 3.1 | Alzheimerova choroba | 11 |
| 3.1.1 | Klinický obraz | 11 |
| 3.1.2 | Příčina onemocnění | 12 |
| 3.1.2.1 | β -amyloid | 12 |
| 3.1.2.2 | Fosforylovaný τ -protein | 13 |
| 3.1.2.3 | Oxidační stres | 14 |
| 3.1.2.4 | Metabolismus cholesterolu | 14 |
| 3.1.2.5 | Zánět | 15 |
| 3.1.3 | Významné enzymy ovlivňující patogenezi Alzheimerovy choroby | 15 |
| 3.1.3.1 | Cholinesterázy | 15 |
| 3.1.3.2 | Molekulární formy cholinesteráz | 17 |
| 3.1.4 | Léčba Alzheimerovy choroby | 19 |
| 3.1.4.1 | Inhibitory acetylcholinesterázy | 19 |
| 3.1.4.2 | Inhibitory NMDA receptorů | 23 |
| 3.2 | Čeleď Amaryllidaceae | 23 |
| 3.2.1 | Klasifikace alkaloidů čeledi Amaryllidaceae | 24 |
| 3.2.2 | Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae | 30 |
| 3.2.3 | Taxonomické zařazení vybraných rodů čeledi Amaryllidaceae, jejich alkaloidy a biologická aktivita | 32 |
| 3.2.3.1 | Rod <i>Nerine</i> | 32 |
| 3.2.3.2 | Rod <i>Scadoxus</i> | 35 |
| 3.2.3.3 | Rod <i>Sprekelia</i> | 37 |
| 3.2.3.4 | Rod <i>Sternbergia</i> | 38 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 40 |
| 4.1 | Všeobecné postupy | 41 |
| 4.1.1 | Destilace a odpařování | 41 |
| 4.2 | Materiál a vybavení | 41 |
| 4.2.1 | Rozpouštědla | 41 |
| 4.2.2 | Chemikálie | 41 |
| 4.3 | Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza | 41 |
| 4.3.1 | Biologický materiál | 41 |
| 4.3.2 | Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu | 42 |
| 4.3.3 | GC/MS analýza a identifikace alkaloidů | 42 |
| 4.4 | Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE | 43 |
| 4.4.1 | Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity | 43 |
| 4.4.2 | Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity | 43 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.4.3 | Podmínky měření | 43 |
| 4.4.4 | Příprava erytrocytárních pouzder | 44 |
| 4.4.5 | Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀) | 44 |
| 4.5 | Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů | 45 |
| 4.5.1 | Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity | 45 |
| 4.5.2 | 4.6.1 Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity | 45 |
| 4.5.3 | 4.6.2 Stanovení antioxidační aktivity (EC ₅₀) | 45 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 46 |
| 5.1 | Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Nerine filifolia</i> Baker a jeho GC/MS analýza..... | 47 |
| 5.2 | Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Nerine undulata</i> (L.) Herb. a jeho GC/MS analýza..... | 49 |
| 5.3 | Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Nerine filamentosa</i> W. F. Barker a jeho GC/MS analýza | 52 |
| 5.4 | Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Scadoxus multiflorus</i> (Martyn) Raf. a jeho GC/MS analýza..... | 55 |
| 5.5 | Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Sprekelia formossisima</i> (L.) Herb. a jeho GC/MS analýza | 56 |
| 5.6 | Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Sternbergia lutea</i> (L.) Ker Gawl. Ex Spreng a jeho GS/MS analýza..... | 58 |
| 5.7 | Antioxidační aktivita extraktů čeledi Amaryllidaceae..... | 60 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 61 |
| 7 | LITERATURA | 63 |
| 8 | SEZNAM ZKRATEK..... | 71 |

1 Úvod

Již od pradávna se využíval potenciál rostlin pro léčbu různých zdravotních stavů, nebo k jejich předcházení. Vědci v starověku se stylem „pokus-omyl“ naučili, které rostliny jsou pro léčbu vhodné a které jsou naopak jedovaté. Původně nebylo známo, která látka nebo skupina látek má za následek účinek dané rostliny, ale postupným rozvojem vědy a techniky, je lidstvo schopné jednotlivé obsahové látky izolovat identifikovat a následně i zkoumat jejich biologickou aktivitu.

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou zkoumány hlavně kvůli jejich vysokému obsahu strukturně různorodých a zajímavých alkaloidů. Alkaloidy tvoří známou a významnou skupinu přírodních látek. Jedná se látky heterocyklické povahy nesoucí ve své molekule jednu nebo více atomů dusíku. Struktura alkaloidů je velice rozmanitá, mohou být alifatické, cyklické i aromatické, mohou mít i steroidní povahu. Pro svou významnou biologickou aktivitu je alkaloidům věnována velká pozornost. Dosud byly alkaloidy nalezeny asi v 4000 rostlinných druzích, přičemž se odhaduje, že asi 10 až 20 % rostlinných druhů obsahuje alkaloidy. Obsah alkaloidů kolísá v průběhu vegetačního období, ale též během dne. Alkaloidy mají lipofilní charakter, většinou jsou to tuhé, bezbarvé, ve vodě málo rozpustné látky. Význam alkaloidů pro rostlinu není zatím jednoznačně objasněn. Jejich toxicita může rostlině působit ochranu proti býložravcům a parazitům. Sama rostlina na jejich syntézu vynakládá mnoho energie a musí vlastnit vysoce specializované enzymy, proto předpokládáme, že alkaloidy mají pro rostlinu ještě jiný, dosud neobjasněný význam. Alkaloidy mohou mít různý účinek na různé organismy. Biogeneticky jsou alkaloidy odvozené většinou od aminokyselin, jmenovitě od ornitinu, lysinu, fenylalaninu, tyrozinu, tryptofanu a histidinu⁸⁷.

V čeledi Amaryllidaceae se nachází vytrvalé rostliny rozšířené především v tropických oblastech světa, které jsou známé hlavně jako rostliny okrasné. Dodnes bylo z rostlin čeledi Amaryllidaceae izolováno více než 500 různých alkaloidů s různými farmakologickými účinky jako antivirotické, antitumorózní, antiparazitické, antibakteriální a jako inhibitory acetylcholinesterázy (AChE). Dodnes je jedním z používaných léčiv Alzheimerovy choroby (AD) galanthamin, jehož mechanismus účinku spočívá v reversibilní selektivní inhibici AChE^{49,52}. V pozdějších stádiích této nemoci, se však dostává do popředí další enzym - butyrylcholinesteráza (BuChE), který je patologicky tvořen gliovými buňkami. Léčba inhibitory AChE je momentálně nejpoužívanější formou terapie Alzheimerovy choroby, ale vzhledem k narůstajícímu významu BuChE v patogenezi této choroby, je potřebné najít látky schopné inhibovat nejenom AChE, ale i BuChE.

2 Cíl práce

Cíle diplomové práce:

1. Příprava alkaloidních extraktů vybraných zástupců čeledi Amaryllidaceae.
2. GC/MS analýza alkaloidních extraktů.
3. Příprava vzorků na biologické testování.
4. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidního extraktu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze a dále stanovení antioxidační aktivity extraktů za využití DPPH testu.

3 Teoretická část

3.1 Alzheimerova choroba

Jedná se o nejrozšířenější formu demence, počítajíc 50-56% případů. Momentálně více než 35 milionů lidí na světě trpí touto chorobou, která se projevuje zhoršením paměti a dalších kognitivních funkcí, které nakonec vedou, v průběhu 3-9 let od diagnózy, ke smrti⁶.

Hlavním rizikovým faktorem je věk – incidence se zdvojnásobuje každých 5 let po 65. roku života¹. Je dokázáno, že Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD) nesouvisí nutně s věkem², nicméně pravděpodobnost diagnózy po 85. roku života je až 1:3⁶.

3.1.1 Klinický obraz

Pro AD je typický plíživý, pomalý začátek, který lze velmi těžce diagnostikovat. Rozlišení prvních poruch paměti od příznaků, které mohou doprovázet normální stárnutí, nemusí být zpočátku jednoduché. Mezi první příznaky, které zprvu zaznamenává pacient i jeho okolí, bývá zapomínání běžných každodenních událostí. Pacient si nedokáže vybavit, co měl k obědu, koho potkal, co měl nakoupit. Výrazně bývá postižena krátkodobá paměť, pacient má problém si zapamatovat nová jména nebo události. Obvykle v časných stádiích se objevují poruchy vizuospeciálních funkcí (prostorová orientace, orientace zrakem v prostoru), pacienti nejsou schopni se orientovat v místech, která znají málo, později mají problém i na místech známých. Dostavují se poruchy soudnosti a logického uvažování, řídne slovní zásoba. Postupně se projevují poruchy výkonných funkcí. V průběhu choroby dochází k postupnému zhoršování intelektových schopností a k zániku náhledu na chorobu (pacient si nemoc přestane uvědomovat). Velmi často se u nemocných dostavuje afázie (porucha chápání), apraxie (pacienti nejsou schopni vykonávat naučené dovednosti), či agrafie (porucha písma) a/nebo alexie (porucha čtení). V pozdějších stádiích dochází k poruchám chování, běžné jsou stavy neklidu, projevy agresivity, pacienti odcházejí z domova a díky poruchám orientace se pak ztrácejí. Významné jsou též emoční poruchy, které se projevují hlavně egocentriem, poměrně častý je i výskyt depresivních stavů, dále se mohou vyskytnout bludy často bizarního obsahu a halucinace (vidiny osob). V pokročilejších stádiích už nejsou nemocní schopni samostatně vykonávat každodenní aktivity, nejsou schopni se bez pomoci obléknout, najíst, natož udržovat hygienu. Pacienti se dostávají do stavu úplné závislosti, při které jsou odkázáni na péči svého okolí. V terminálních stádiích AD bývají nemocní upoutáni na lůžko, dostavuje se inkontinence moči i stolice, mají obtíže s příjmem potravy a dochází k rozvoji dekubitů.

AD trvá zpravidla několik let, výjimečně více než 10 let od objevení se prvních klinických příznaků. Presenilní formy, objevující se ještě před 60. rokem života, jsou spojeny především s familiárním výskytem a mívají zpravidla rychlejší průběh. Pacienti umírají na interkurentní choroby, selhání životních funkcí, někdy i na následky úrazů³.

3.1.2 Příčina onemocnění

Etiologie této nemoci je pořád neznámá, nicméně, existuje několik hypotéz, které se snaží alespoň z části vysvětlit, jaké patologické procesy tuto nemoc provázejí:

3.1.2.1 *β -amyloid*

β -amyloid ($A\beta$) byl původně identifikován přes purifikaci strukturálních jader patologických amyloidních plaků a cév zapojených do mozkové amyloidní angiopatie⁴. Identifikace $A\beta$ jako metabolický produkt prekurzoru proteinu β -amyloidu ($A\beta$ PP), jeho pozice na chromozomu 21 a identifikace dědičné AD nesoucí patogenetické $A\beta$ PP mutace předurčuje $A\beta$ jako hlavní molekulu v patogenezi AD. $A\beta$ je tvořen z mnohem většího $A\beta$ PP, integrální typ membránového glykoproteinu, úplně exprimován obsahuje krátký cytoplasmatický „ocas“, transmembránovou část a relativně velkou extracelulární doménu. Existuje několik isoform $A\beta$ PP⁵. Enzymatické štěpení $A\beta$ PP α -sekretázou nebo β -sekretázou produkuje N-koncové fragmenty. Další štěpení pomocí γ -sekretázy vede k vyloučení a sekreci nepatogenního p3 peptidu (předchozí štěpení α -sekretázou) a $A\beta$ (předchozí štěpení β -sekretázou). Závisí na přesném místě štěpení γ -sekretázou, produkce různých délek $A\beta$ lišících se počtem aminokyselin od 38 do 43. Forma $A\beta$ 42 (42 aminokyselin) má větší tendenci formovat fibrily v porovnání s ostatními formami. Štěpení kombinací β - a γ -sekretázy má za následek vznik $A\beta$ peptidu⁵.

Mozkové plaky s β -amyloidními peptidy ($A\beta$) a dystrofickými neurity v neokortikálních terminálních oblastech jako i neurofibrilární pleteně v medialním temporálním laloku jsou důležité patologické struktury u Alzheimerovy nemoci. Ztráta neuronů a bílé hmoty, amyloidní angiopatie, zánět a oxidativní poškození jsou též přítomny⁶.

β -amyloidní peptidy pocházejí z proteolýzy s amyloidním proteinovým prekurzorem (APP) sekvencí enzymatických reakcí BACE-1 (β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1), β -sekretázy a γ -sekretázy a komplexu proteinů s presenilinem 1⁷.

Nerovnováha mezi produkcí, clearance a agregací peptidu zapříčiňuje akumulaci A β a to může být spouštěcím faktorem Alzheimerovy nemoci - tzv. amyloidní hypotéza - je založena na studiích genetické formy Alzheimerovy nemoci⁶.

A β spontánně agreguje do několika koexistujících fyzických forem. Jedna forma se skládá z oligomerů (2-6 peptidů), které se slučují do přechodných shluků⁸. Rozpustné oligomery a přechodné amyloidy jsou nejvíc neurotoxické formy A β ⁹.

Vážnost kognitivního defektu u Alzheimerovy nemoci koreluje s hladinou oligomerů v mozku, ale ne s celkovým množstvím A β . Fyziologické hladiny synaptických A β mohou snížit excitační transmissi a zabránit neuronální hyperaktivitě¹⁰.

Proteázy neprilysin a insulin-degradující enzym regulují hladiny A β , přičemž neprilysin, membránu stabilizující endopeptidasa, degraduje A β monomery i oligomery¹¹, zatímco insulin degradující enzym, thiol-metaloendopeptidasa, degraduje malé peptidy jako insulin a monomery A β ¹³. Redukcí neprilysinu dochází k akumulaci A β v mozku¹², naproti tomu nadměrná exprese neprilysinu nebo insulin degradujícího enzymu formaci plaků zabraňuje¹⁴.

3.1.2.2 *Fosforylovaný τ -protein*

Tauopatie způsobují u AD a jiných neurodegenerativních onemocnění neurofibrilární pleteně, což jsou vláknité inkluze v pyramidových nervových buňkách¹⁵. Počet neurofibrilárních pletení je patologický marker vážnosti AD. Důležitá součást pletení je abnormálně hyperfosforylována a agregována forma τ -proteinu, která je cytotoxická a způsobuje poškození kognitivních funkcí. Hyperfosforylovaný τ -protein je nerozpustný a spojen do párových helixů. Enzymy, které přidávají a odstraňují fosfátové zbytky, regulují velikost fosforylace τ -proteinu^{16,17}.

Více než 30 mutací τ -proteinu na chromosomu 17 bylo detekováno u frontotemporální demence spojené s parkinsonismem¹⁸. Naopak u AD se mutace τ -proteinu nevyskytuje a ztráta neuronů je proporcionální k počtu neurofibrilárních pletení¹⁹. Nicméně zvýšené hladiny fosforylovaného a celkového množství τ -proteinu v mozkomíšním moku koreluje se snížením výsledků kognitivních vyšetření²⁰, přičemž jejich zvýšené hladiny v mozkomíšním moku vytváří společně biomarker, který s vysokou pravděpodobností předvídá progresi AD u pacientů s mírnou kognitivní poruchou²¹. Experimentální důkazy ukazují, že A β akumulace spouští tau agregaci²².

3.1.2.3 Oxidační stres

Oxidační stres je všeobecný termín používaný k popsání rovnovážného stavu hladin oxidačního poškození v buňce, které je způsobeno reaktivními kyslíkovými radikály a nerovnováhou mezi buněčnými oxidanty a antioxidačními procesy. Toto poškození může ovlivnit specifické molekuly nebo celý organismus. Aktivované mikroglie a astrocyty uvolňují volné radikály a prozánětlivé faktory u AD. Volné radikály a prozánětlivé faktory přispívají k patogenezi oxidačního stresu. Oxidační poškození a citlivost k oxidačnímu stresu se s věkem zvyšuje²³⁻²⁵. Cesta a mechanismus oxidačního poškození u AD hlavně zahrnuje peroxidaci lipidů, proteinovou a DNA oxidaci²⁶.

Porucha funkce mitochondrií způsobuje uvolnění oxidativních radikálů a u AD i normálně stárnoucího mozku zapříčiňuje závažný oxidační stres²⁷.

A β , účinný generátor reaktivních kyslíkových radikálů²⁸ a reaktivních dusíkatých radikálů²⁹, je primární původce těchto poškození. Mitochondriální peroxid vodíku difunduje do cytosolu, kde se podílí na vzniku, kovovým iontem katalyzovaného, hydroxylového radikálu. Stimulované mikroglie jsou hlavním zdrojem vysoce rozpustného NO radikálu⁶.

3.1.2.4 Metabolismus cholesterolu

Deficit v metabolismu cholesterolu je atraktivní hypotéza spojená s patogenezi AD, protože spojuje k sobě apolipoprotein E (APOE) – genetické riziko, produkci a agregaci A β a vaskulopatii. Cholesterol je esenciální komponenta neuronálních membrán a je koncentrován ve sfingolipidech nazývaných „lipidové řady“. Tyto řady jsou uspořádány do platform pro shluk β -sekretázy a γ -sekretázy a spojení amyloidního prekurzorového proteinu do A β . Produkce a agregace A β je podporována a clearance v mozku je snížena, když nadbytek esterifikovaného cholesterolu mění membránové lipidy. Gliální APOE je hlavní transportér cholesterolu v mozku. Existuje několik isoform APOE: APOE2, APOE3, APOE4⁴⁶.

APOE4 není jenom patologický nosič způsobující depozici A β ⁴⁷ a tau fosforylaci⁴⁸, ale je také nejméně účinná isoforma, co se týče „uptake“ lipoproteinových částic.

Vysoká sérová hladina cholesterolu ve středním věku zvyšuje riziko AD. Použití statinů ukázalo, že má za následek snížení hladiny volného cholesterolu a s tím spojené snížení rizika AD. Jiné důsledky podávání statinů zahrnují snížení zánětlivosti a up-regulují α -sekretázu a cévní funkčnost⁶.

3.1.2.5 Zánět

Aktivované mikroglie a reaktivní astrocyty určují polohu fibrilárních plaků a jejich biochemické markery jsou zvýšeny v mozku u pacientů s AD. Zpočátku fagocytární mikroglie pohlcují a degradují A β . Nicméně chronicky aktivované mikroglie vylučují chemokiny a kaskádu cytokinů – interleukin-1, -6 a tumor nekrotizující faktor (TNF- α). Společně s vaskulárními buňkami mikroglie exprimují receptory pro koncové produkty glykosylace, které váží A β a tím zesilují cytokiny, glutamát a oxidy dusíku.

Fibrilární A β a gliální aktivace také stimuluje klasickou cestu komplementu. Pleteně a plaky obsahují komplementové produkty C1q a C5b-9, které ukazují, že opsonizace a autolýza neprobíhají v dostatečné míře. Stimulované astroglie taktéž vylučují reaktanty akutní fáze – α 1-chymotrypsin, α 2-makroglobulin a C-reaktivní protein.

Bylo prokázáno, že nesteroidní antiflogistika (NSAID) snižují riziko AD a zpomalují progresi nemoci. Jejich mechanismus účinku zahrnují selektivní redukci A β 42, inhibici cyklooxygenázy-2 nebo receptoru pro prostaglandin E2, stimulaci fagocytózy mikroglie a aktivaci PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)⁶.

3.1.3 Významné enzymy ovlivňující patogenezi Alzheimerovy choroby

3.1.3.1 Cholinesterázy

Cholinesterázy jsou široce rozšířeny enzymy, které se nacházejí v cholinergních i non-cholinergních tkáních, jak v plazmě, tak i jiných tělních tekutinách³³⁻³⁴. Dělíme je do dvou tříd, dle jejich substrátové specifity, chování k nadbytku substrátu a citlivosti vůči inhibitorům, na acetylcholinesterázu (AChE) nebo „pravou“ cholinesterázu a butyrylcholinesterázu (BuChE) nebo též pseudocholinesterázu³⁵. AChE a BuChE sdílejí 65% homologní sekvence AMK, mají podobné molekulární formy a aktivní centrální strukturu³⁶. Mají rozdílnou i specifickou tkáňovou distribuci – AChE se hojně vyskytuje v mozku, svalu a erytrocytární membráně, zatímco BuChE má vyšší aktivitu v játrech, střevech, srdci, ledvinách a plicích³⁷.

V CNS jsou 2 hlavní typy cholinergních neuronů. Jedna skupina sídlí v oblasti bazálního předního mozku mezi rostrálními oblastmi *Nucleus caudatus* a anteriorní perforovanou substancí, která inervuje mozkovou kůru, hipokampus a amygdala. Druhá skupina existuje ve

Varolově mostu a posílá své výběžky ascendentně k thalamu a jiným jádrům v diencefalonu do pons/prodloužené míchy, mozečkových jader a jader lebečního (kraniálního) nervu³⁸.

Ačkoli u pacientů s AD byly pozorovány deficity i jiných neurotransmiterů (Tab. 1) nebo abnormality mimo cholinergní systém, cholinergní poškození získalo pevnou pozici ve zkoumání AD³¹.

Tab. 1 Změny v neurotransmiterním systému v mozku postiženém Alzheimerovou chorobou³⁰

| Neurotransmiterní systém | Změny |
|--------------------------|---|
| Cholinergní | cholinergní neurony bazálního předního mozku ↓↓ |
| | aktivity cholin-acetyltransferázy ↓↓ |
| | aktivita acetylcholinesterázy ↓↓ |
| | M1 muskarinní receptory → |
| | M2 muskarinní receptory ↓ |
| | nikotinové receptory ↓ |
| Noradrenergní | noradrenergní neurony locus coeruleus ↓ |
| | noradrenalin ↓ |
| | MHPG ↓ |
| | dopamin β-hydroxylasa ↓ |
| | α1, α2, β receptory → |
| Serotoninergní | serotoninergní neurony nucleus raphe ↓ |
| | serotonin ↓ |
| | 5-HIAA ↓ |
| Dopaminergní | dopamin → |
| | HVA → |
| | monoaminoxidáza B ↑ |
| Gabaergní | γ-aminomáselná kyselina →/↓ |
| | glutamátdekarboxylasa → |
| Neuropepidy | |
| Somatostatin | imunoreaktivita ↓↓ |
| CRF | imunoreaktivita ↓↓ |
| Neurotensin | imunoreaktivita ↓ |
| opiooidové peptidy | imunoreaktivita → |
| substance P | imunoreaktivita → |
| Cholecystokinin | imunoreaktivita → |
| VIP | imunoreaktivita → |
| TRH | imunoreaktivita → |

Vysvětlivky: → žádná změna; ↓ snížení; ↑ zvýšení; ↓↓ markantní snížení

Cholinacetyltransferáza je enzym, který biosyntetizuje ACh z cholinu a acetylCoA (acetylkoenzym A) na nervových zakončeních. Na základě studií bylo zjištěno, že dochází k jejich vyčerpání ve specifických částech mozku u pacientů trpících AD. To znamená, že AD byla popsána jako deinervující poškození centrálních cholinergních nervových výběžků do mozkové kůry a limbického systému. Ne všechny cholinergní neurony jsou postiženy, ale

mozková kůra, konkrétně v temporální části mozku a sousedních limbických oblastí, je postižena těžce³¹.

Acetylcholin (ACh) byl prvním identifikovaným neurotransmiterem, který stimuluje *nervus vagus* a zpomaluje srdeční tep³⁰.

3.1.3.2 Molekulární formy cholinesteráz

AChE a BuChE představují podobně amfifilní nebo rozpustné molekulární formy s různou distribucí v tkáních a tělních tekutinách. Jsou to homo- anebo heterogenní formy, sumarizované takto:

1. U typu I, amfifilní dimery, se jedná o ukotvené glykofosfatidylinositol-dimery v plasmatických membrách savčích svalů, erytrocytů a lymfocytů. Je to hojná forma AChE, která je rozpustná jenom pomocí detergentů a v jejich nepřítomnosti agreguje.
2. Typ II, amfifilní monomery a dimery, je odlišný od typu I díky tomu, že postrádá glykolipidové konce a neagreguje v nepřítomnosti detergentů. Je rozpustný v roztocích solí a ve velkém počtu se nachází v savčích mozcích, svalech a střevě ve formě obou cholinesteráz (AChE i BuChE).
3. Tetramery s hydrofobními konci jsou ukotvené v plasmatických membránách pomocí hydrofobní, 20 kDalton dlouhé, polypeptidové podjednotky. Tato forma se hojně vyskytuje u AChE v savčím CNS.
4. Formy s kolagenu podobným koncem nebo asymetrické formy jsou charakterizovány přítomností ukotveného kolagenu podobnému konci k bazální lamině. Je formována pomocí trojitě helikální struktury složené z 3 kolagenových podjednotek Q, z nichž každá je spojena s jedním (A4), dvěma (A8), nebo třemi (A12) tetramery cholinesteráz. Je hojnější pro AChE než BuChE v nervosvalové ploténce.
5. Rozpustné tetramerní formy (G4) jsou složené ze 4 identických monomerů a stabilizované hydrofobní interakcí pomocí hydrofobní aminokyseliny na C-konci monomeru. Tato forma se hojně vyskytuje u BuChE v savčích tělních tekutinách a rozpustné frakci tkáňových homogenátů^{40,41}.

Acetylcholinesteráza (AChE)

Acetylcholinesterázu (EC 3.1.1.7) tvoří komplex proteinů typu α/β hydrolázy. Strukturální znalost je založena na práci provedené na enzymu *TcAChE* získané z elektrického úhoře *Torpedo californica*. Struktura savčí AChE je velice podobná *TcAChE* a většina *in vitro* prací zabývajících se studiem inhibičních vlastností, jak přírodních, tak i syntetických látek vůči AChE byla provedena na komerčně dostupné AChE získané z elektrického úhoře (*TcAChE*)³².

Hlavní funkce AChE je rychlá hydrolýza neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) na cholinergních synapsích³⁵. Dochází k hydrolýze esterické vazby v molekule, což má za následek ztrátu stimulační aktivity. Inhibice AChE má za následek prodloužení existence a tím i aktivity ACh. Tento koncept se ujal v medicíně, kde se využívá k léčbě nemocí spojených s nedostatečnými hladinami ACh. V několika posledních letech bylo zjištěno, že AChE je zapojena do několika dalších funkcí, mimo nervovou transmisi. Funguje jako adhesivní protein, protein kostní matrix, uplatňuje se při růstu neuritů a produkci amyloidních fibril, které jsou charakteristické pro mozkové buňky pacientů s AD³².

Butyrylcholinesteráza (BuChE)

Butyrylcholinesteráza (EC 3.1.1.8) je díky své struktuře zapojena ve 3 různých enzymatických aktivitách – esteráza, aryl acylamidáza a peptidáza (nebo proteáza) tak jako její sesterský enzym – acetylcholinesteráza. Její skutečná fyziologická funkce je však stále neznámá. Esterázová aktivita BuChE se stává důležitější v regulování cholinergní transmise při nepřítomnosti AChE a v inaktivaci některých léků jako kokain, aspirin, amitriptylin nebo v aktivaci jiných jako bambuterol, heroin. Peptidázová aktivita BuChE má funkci ve vývoji a progresi AD kvůli tomu, že zapříčiňuje produkci β -amyloidního proteinu a pomáhá jeho rozšiřování v β -amyloidní plaky. Předpokládá se, že aryl acylamidázová aktivita hraje roli při serotoninergní a cholinergní neurotransmisí³⁵.

BuChE má farmakologickou a toxikologickou důležitost a roste i její důležitost jako detoxikačního enzymu, protože hydrolyzuje léky obsahující ester a vychytává inhibitory cholinesterázy zahrnující účinné organofosfátové nervové zástupce předtím než dosáhnou jejich synaptický cíl⁴².

Navzdory tomu, že skutečný substrát je stále neznámý, BuChE může hydrolyzovat hydrofobní i hydrofilní karboxylové nebo fosforečné estery kyselin. Jeho toxikologická a farmakologická důležitost se stává jasnější, když jednotlivá expozice k jedovatým složkám

je zaměřena na místo, kam se váže ACh. Ztráta funkce AChE vede k paralýze svalu, křečím a může způsobit smrt udušením. BuChE může být považována za endogenního vychytávače anticholinesterázových složek. BuChE je detoxikuje předtím, než dosáhnou AChE na fyziologicky důležitých cílových místech³⁵.

BuChE je distribuována v periferních tkáních, séru a gliálních buňkách v CNS a její koncentrace roste s progresí AD⁴⁵.

3.1.4 Léčba Alzheimerovy choroby

Léčba Alzheimerovy choroby i dalších demencí neurodegenerativního původu vychází ze znalosti jednotlivých patogenetických článků, nikoli ze znalostí základní příčiny. Současná terapie nám tedy umožňuje chorobu modulovat, především prodlužovat lehká stadia a oddalovat těžká stadia demence, která jsou spojena s nesoběstačností a silnou zátěží jak pacientů, tak jejich pečovateli.

U Alzheimerovy choroby jsou 2 farmakoterapeutické postupy, které jsou založeny na důkazech (evidence – based) – tj. výsledcích více rozsáhlých, multicentrických, multietnických randomizovaných dvojitě slepých studií⁴³.

Jedná se o:

1. Inhibitory AChE při lehkých a středních formách AD (takrin, donepezil, galantamin, rivastigmin)
2. Inhibitory NMDA receptorů při pokročilých stádiích AD (memantin)

Tato léčiva jsou doporučována pro symptomatickou léčbu. Nicméně jsou tu stále nevyřešené problémy s použitím těchto dostupných léčiv, např. terapie inhibitory acetylcholinesterázy byla považována za účinnou pouze v krátkém časovém úseku trvajícím 6-12 měsíců, a že působí jenom u některých pacientů. Díky komplexnosti onemocnění může být kombinovaná terapie jedna z nejlepších strategií, která zlepší účinnost léčby⁴⁴.

3.1.4.1 *Inhibitory acetylcholinesterázy*

Cholinergní hypotéza u AD je založena na skutečnosti, že degenerace cholinergních neuronů v bazálních jádrech předního mozku zapříčiňuje poruchu v presynaptických

cholinergních neuronech v hippocampu a neokortexu, což vede k poruchám paměti a dalším kognitivním symptomům.

Jedna terapeutická možnost zlepšení cholinerní neurotransmise spočívá v zlepšení dostupnosti ACh pomocí inhibice cholinesterázy (enzym, který degraduje ACh v synaptické štěrbině)⁴⁴.

Cholinomimetika aktivují mozkový cholinerní systém a tím intervenují se symptomy AD, proto se jeví jako další možnost na zmírnění těchto symptomů. Klinické testy provedené s cholinomimetiky vedly ke zjištění, že v mnoha aspektech jsou centrální cholinerní léze spojeny se symptomy AD³¹.

Inhibitory acetylcholinesterázy – takrin, donepezil, rivastigmin a galanthamin jsou registrovány pro symptomatickou léčbu pacientů s mírnou až střední formou AD, z nichž jako první byl, v USA a Evropě, registrován takrin, následován donepezilem, rivastigminem a galanthaminem. Druhá generace inhibitorů acetylcholinesterázy může vyvinout doplňkový farmakologický účinek. *In vitro* modely ukázaly, že inhibitory acetylcholinesterázy mohou zvýšit sekreci rozpustného prekurzoru amyloidního proteinu (APP). APP je integrální membránový protein s komplexním proteolytickým mechanismem regulovaným několika protézami. Postupné kroky dvou enzymů, β - a γ -sekretázy, vedou k tvorbě $A\beta$, zatímco α -sekretáza uvolňuje rozpustný N-koncový fragment, nazývaný sAPP α ⁴⁴.

Jako první inhibitory cholinesterázy se používali fysostigmin a takriny. Fysostigmin je účinný a kompetitivní inhibitor cholinesterasy, který přednostně inhibuje AChE v porovnání s BuChE. Bylo zjištěno, že fysostigmin zlepšuje dlouhodobou paměť. Kombinace fysostigminu s lecitinem ukázala zlepšení kognitivních funkcí u AD. Tato skutečnost je ale závislá na dávce, jelikož má extrémně krátký poločas (15-30 minut) a relativně silné periferní vedlejší účinky.

Takrin byl prvním lékem schváleným na léčbu AD. Jedná se o centrálně působící reversibilní inhibitor cholinesterázy, který zlepšuje kognitivní funkce a chování AD pacientů při dávkách 80-160 mg/den, nicméně způsobuje závažné nežádoucí účinky. Tyto vedlejší účinky a přístupnost méně toxických molekul dnes limituje jeho užitečnost v léčbě AD.

Nyní se předepisují pouze 3 inhibitory cholinesterázy – donepezil, rivastigmin a galanthamin³¹.

Donepezil

Donepezil (Aricept[®]) (Obr. 1) byl vyvinut, aby předešel nevýhodám takrinu (hepatotoxicita apod.). Jeho základem je piperidin a je vysoce selektivní pro AChE s viditelně nižší afinitou pro BuChE. 5-10 mg/den viditelně zlepšuje kognitivní funkce, ve všeobecnosti je dobře tolerován, s typicky cholinergními vedlejšími účinky jako nauzea, zvracení, průjem, zácpa, bolest hlavy, závrať a poruchy spánku, jsou však mírné a přechodné⁴⁴.

→ potenciál modifikace nemoci

Zájem o inhibitory cholinesterasy v léčbě AD byl obnoven díky objevu dodatečných cholinergních a non-cholinergních účinků, které maximalizují účinek těchto léčiv nejenom pro zmírnění symptomů, ale také pro zlepšení procesu choroby⁴⁴.

→ modulace NMDA receptorů

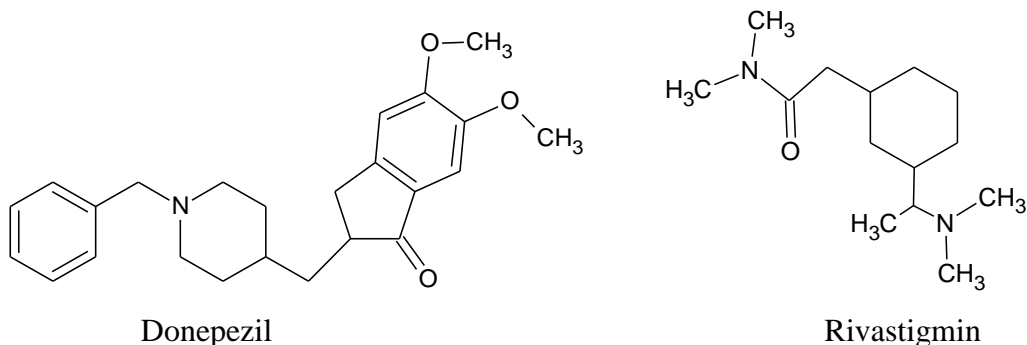
Je známo, že nikotinové acetylcholinové receptory a N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory působí jako down-regulátory v mozku AD pacientů. Donepezil potencuje aktivitu NMDA receptorů a tento krok by spolu s inhibicí cholinesterasy mohl přispět k zlepšení učení, paměti a kognici⁴⁴.

→ neuroprotektivní efekt

Donepezil má i neuroprotektivní vlastnosti, který spočívá v ochraně kortikálních neuronů proti glutamátové neurotoxicitě skrz $\alpha 4$ - a $\alpha 7$ -nikotinové receptory a zároveň vyvolává up-regulaci nikotinových receptorů v kortikálních neuronech a tím zlepšuje neuroprotektivní vlastnosti⁴⁴.

Rivastigmin

Rivastigmin (Exelon[®]) (Obr. 1) je pseudoreversibilní inhibitor AChE. V dávce 6-12 mg/den produkuje klinicky signifikantní benefity v oblastech spojených s kognicí, denními aktivitami a chováním u pacientů s AD. Vedlejší účinky ovlivňují hlavně gastrointestinální trakt (GIT)⁴⁴.



Obr. 1 Strukturální vzorce léčiv donepezilu a rivastigminu

Galanthamin

Poslední látkou registrovanou pro léčbu AD je galanthamin (Reminyl[®])⁴⁴. V medicíně se používá od 60. let 20. století, převážně ve východní Evropě, pro svůj antikurarový efekt k antagonizování neuromuskulární blokady a pro terapii neurologických poruch. Cílovými místy účinku galanthaminu v organismu jsou nervosvalové spoje, centrální cholinergní synapse i periferní orgány inervované parasympatickými vegetativními vlákny. Na cholinergní synapsi má dvojí roli, a to takovou, že může zvýšit hladinu acetylcholinu dostupného pro aktivitu postsynaptických muskarinových receptorů tím, že inhibuje AChE, nebo může působit jako alosterický modulátor na nikotinových receptorech, protože v přítomnosti galanthaminu je zvýšená vazebná afinita ACh na acetylcholinový nikotinový receptor nebo i zvýšená propustnost kanálů odpovídající obsazeným receptorům. Modulaci nikotinových receptorů je tak podporován proces uvolňování ACh cestou nikotinového mechanismu, zvláště za podmínek poškození cholinergní funkce. Působí jako reversibilní kompetitivní inhibitor AChE a také alostericky moduluje nikotinové receptory, čímž potencuje cholinergní nikotinovou neurotransmisi. Galanthamin se po p.o. (per os, podání ústy) podání snadno absorbuje, prakticky nezávisle na lékové formě (tableta, obalená tableta, roztok). Při studiu vlivu jídla na absorpci bylo zjištěno, že jídlo sice neovlivňuje celkovou dostupnost galanthaminu, nicméně absorpci zpomaluje⁸⁸. Dávka 16-24 mg/den působí prospěšně na kognitivní i non-kognitivní symptomy AD a jeví příznivé farmakokinetické vlastnosti s vysokou biodostupností⁴⁴. Hlavní nežádoucí účinky galanthaminu souvisí s jeho cholinergními vlastnostmi a mezi nejčastější patří nevolnost, zvracení, závrať, bolesti břicha, průjem, neklid, poruchy spánku a lehká bolest hlavy. Vyznamným nežádoucím efektem užívání galanthaminu je ztráta hmotnosti a chuti k jídlu. Nežádoucí účinky však mohou být tlumeny pomocí profylaktického podání periferního antidota *N*-methylskopolamin hydrobromidu⁸⁸.

Několik studií ukázalo, že galanthamin chrání proti glutamátům způsobené neurotoxicitě. Jeho neuroprotektivní účinek je zprostředkován skrze nikotinové receptory, konkrétně $\alpha 7$ -nikotinové receptory⁴⁴.

Další informace týkající se zdrojů této látky a její vzorec, izolace z přírodního materiálu a její dostupnost budou podrobně zmíněny v kapitole pojednávající o alkaloidech čeledi Amaryllidaceae.

3.1.4.2 Inhibitory NMDA receptorů

Skupina inhibitorů NMDA receptorů je zastoupena jediným dnes používaným léčivem, memantinem⁴³.

Glutamát je hlavní excitační neurotransmiter v mozku. Za normálních podmínek hraje důležitou roli v procesu učení a paměti. Nicméně, za abnormálních podmínek, jako u AD, excitotoxicita zapříčiněná nadměrnou stimulací NMDA receptorů, díky zvýšené koncentraci glutamátu, může vést k buněčné smrti spojené s nadměrným příjmem Ca^{2+} . Nadměrná stimulace NMDA receptorů vede k poškození synapse a potažmo k poškození neuronální funkce⁴⁴.

Memantin

Memantin působí jako nekompetitivní antagonist napětově závislých NMDA receptorů. Vyznačuje se neuroprotektivními účinky, zabraňuje NMDA indukované smrti buněk v hippocampu a současně nekompetitivně blokuje a inhibuje $\alpha 7$ nikotinové receptory. V literatuře se uvádí, že tato inhibice je dokonce účinnější než NMDA receptory⁴⁴.

3.2 Čeleď Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae představuje skupinu jednoděložných rostlin zahrnující přibližně 85 rodů a 1100 druhů, které jsou rozšířeny zejména v tropických a teplých oblastech světa. Představují velmi významný a bohatý zdroj nových látek pro terapeutické účely. Nejvýznamnějšími sekundárními metabolity těchto rostlin jsou tzv. amaryllkovité alkaloidy, strukturně patřící mezi isochinolinové alkaloidy. Pro svoji biologickou hodnotu jsou tyto

alkaloidy předmětem intenzivního výzkumu, zejména v rámci vlastní izolace, stanovení biologické aktivity a jejich chemie⁴⁹.

Jedná se o vytrvalé byliny s cibulemi. Listy mají čárkovité, buď jen přízemní, nebo také lodyžní. Květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem, jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích. Plodem je tobolka nebo bobule⁵¹.

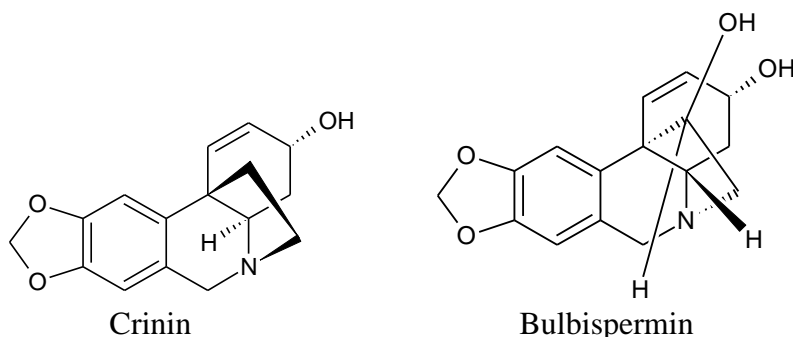
Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou významné tím, že produkují strukturně unikátní alkaloidy se širokou škálou zajímavých fyziologických účinků – antivirové, protirakovinné, inhibiční vůči AChE, imunostimulační a antimalarické⁷³.

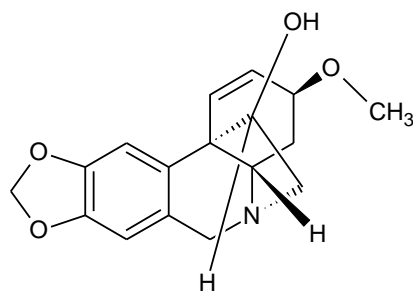
3.2.1 Klasifikace alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou dle literárních zdrojů rozděleny podle své chemické struktury do 18 typů, z nichž nejvýznamnější jsou: krininový, galanthaminový, lykorinový a montaninový. Zbytek je shrnut v Tab. 4, spolu se základní strukturou a rody, ve kterých se nejčastěji nachází⁵².

Krininový typ

Základním alkaloidem tohoto typu je krinine (Obr. 2) a nachází se hlavně u rodů *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Narcissus*, *Nerine* a *Hymenocallis*⁵². Alkaloidy této strukturní skupiny byly testovány na cytotoxickou aktivitu vůči gliovým buňkám resistantním k apoptóze a projevil též silnou antiproliferativní aktivitu, jmenovitě alkaloidy bulbispermin, haemanthamin (Obr. 2) a haemantidin⁹⁰.



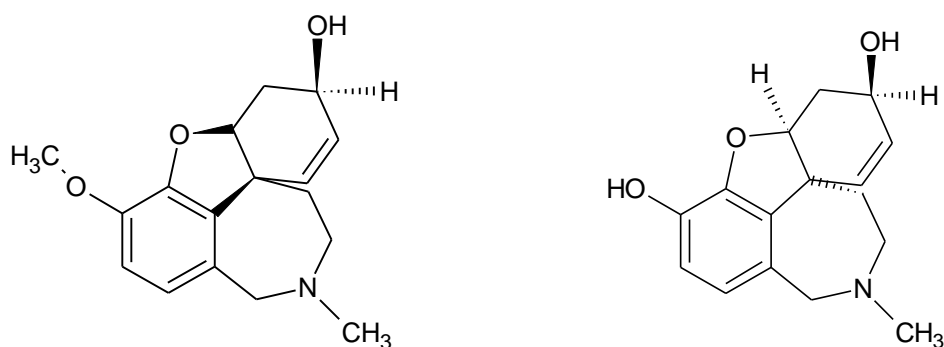


Haemnanthin

Obr. 2 Struktury krininu, heamnanthaminu a haemnanthidinu

Galanthaminový typ

Tento typ alkaloidů se nachází především v rodech *Amaryllis*, *Chlidanthus*, *Crinum*, *Galanthus*, *Haemanthus*, *Hymenocallis*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*, *Nerine*, *Pancreatium*, *Sternbergia* a *Zephyranthes*, přičemž obsah alkaloidů byl ovlivněn podmínkami pěstování. Při zemědělském pěstování (na poli, při umělém zavlažování) vykazovali průměrně nízkou koncentraci alkaloidů, na rozdíl od rostlin pěstovaných za optimálních podmínek (v lese, v místě jejich přirozeného výskytu), kde byl obsah alkaloidů mnohem vyšší. Nejznámějším zástupcem je galanthamin. Jedná se o terciární alkaloid původně izolovaný z cibulí sněženky *Galanthus woronowi*, který je rezistentní vůči hydrolyze. Pro jeho vazebné schopnosti a tedy i biologický účinek jsou v molekule důležitá 4 místa: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina (Obr. 3).



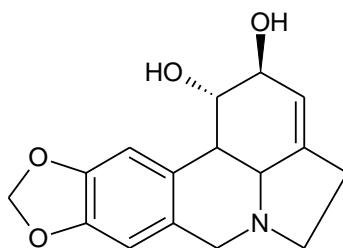
Obr. 3 Struktura galanthaminu a sanguininu

Obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny (např. za kvarterní amoniou sůl nebo hydrofilní sloučeniny) byly připraveny deriváty galanthaminu, které byly polárnější než původní molekula a vykazovaly větší inhibici vůči AChE, nicméně jejich polarita brání průniku do CNS, což výrazně limituje jejich použití⁸⁸. Dalším zástupcem je sanguinin

(Obr. 3), *O*-demetylovaný derivát galanthaminu, který je mnohonásobně biologicky aktivnější, ale zastoupení v alkaloidním profilu rostlin je několikanásobně nižší.

Lykorinový typ

1-Acetyllykorine byl prokázán jako silný inhibitor AChE, naproti tomu lykorin (Obr. 4), jakožto hlavní zástupce a jeho deriváty 1,2-diacetyllykorin a 2-acetyllykorin mají inhibiční aktivitu vůči AChE minimální. Zároveň se zkoušeli účinky těchto alkaloidů proti rakovinným buňkám a interakce s cytochromem P450 3A4 (CYP450 3A4) a zatímco lykorin působil cytotoxicky, substituce jedné nebo obou jeho hydroxylových skupin tuto aktivitu snižuje. Lykorin při testování jeho interakce s CYP450 3A4 prokázal jako neaktivní, ale při substituci se aktivita vůči tomuto cytochromu rapidně zvýšila⁹¹. Tento typ alkaloidů lze nalézt ve větším množství především v rodech *Amaryllis*, *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Leucojum*, *Narcissus* a *Zephyranthes*⁵².

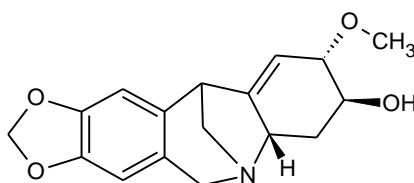


Lykorin

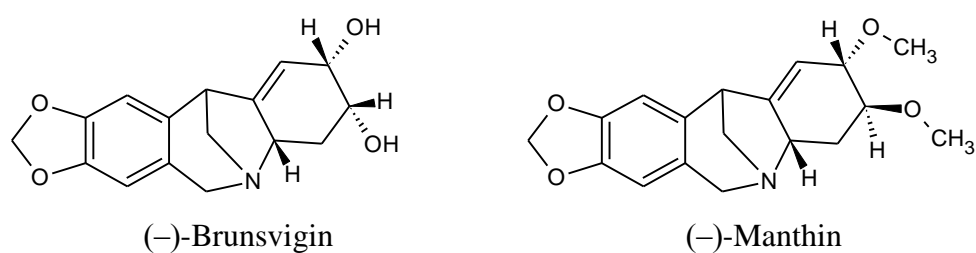
Obr. 4 Struktura lykorinu

Montaninový typ

Hlavními zdroji alkaloidů tohoto typu jsou především rody *Boophane*, *Brunsvigia*, *Haemanthus*, *Hymenocallis* a *Narcissus*⁵² a hlavním zástupcem je montanin (Obr. 5). Dalšími zástupci, kteří se vyznačují významnou biologickou aktivitu jsou brunsvigin a manthin (Obr. 4), které mají důležitou biologickou aktivitu, zahrnující anxiolytický, antidepressivní a antikonvulzivní efekt⁸⁹.



Montanin

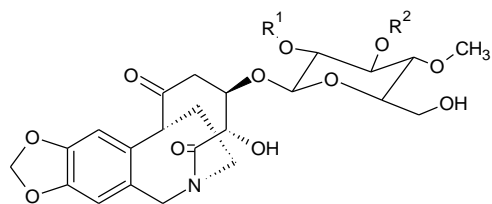


Obr. 5 Struktura montaninu a jeho derivátů

Tab. 2 Další známé strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, jejich příklady a rostlinné rody je obsahující⁵²

| Strukturní typ | Příklad alkaloidu | Rostlinné rody |
|-----------------|---|--|
| Belladinový | <p style="text-align: center;">Belladin</p> | <i>Crinum, Nerine</i> |
| Galanthindolový | <p style="text-align: center;">Galanthindol</p> | <i>Galanthus, Lycoris</i> |
| Homolykorinový | <p style="text-align: center;">Homolykorin</p> | <i>Clivia, Galanthus, Heamanthus, Lycoris, Narcissus</i> |
| Galasinový | <p style="text-align: center;">Galasin</p> | <i>Galanthus, Hosta plantaginea (Liliaceae)</i> |

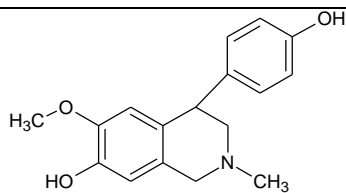
Kripowellinový



Crinum

Kripowellin A (R1, R2 = -CH₂OCH₂-)
Kripowellin B (R1, R2 = -CH₃)

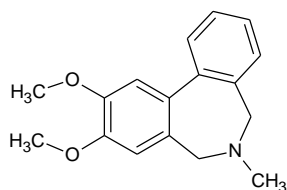
Cheryllinový



Cheryllin

Crinum

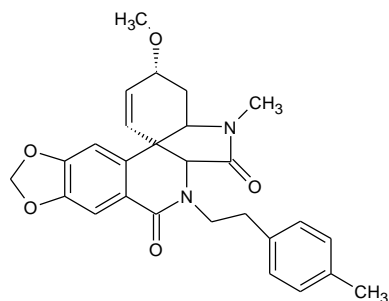
Buflavinový



Buflavin

Boopane

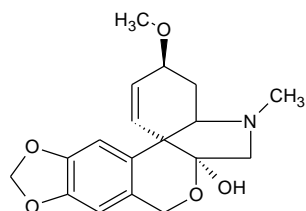
Plikaminový



Plikamin

Cyrtanthus, Galanthus

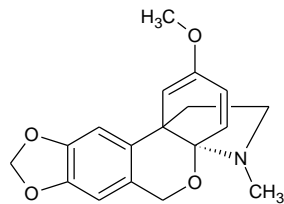
Tazzetinový



Tazzetin

*Crinum, Eucharis,
Galanthus,
Hippeastrum,
Hymenocallis*

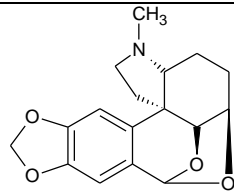
Gracilinový



Galanthus

Gracilin

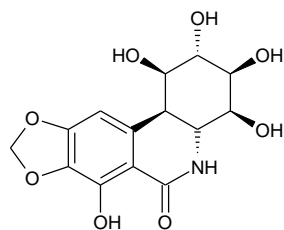
Augustaminový



Crinum

Augustamin

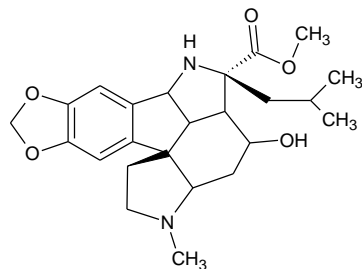
Pankratistatinový



*Crinum, Hippeastrum,
Hymenocallis,
Zephyranthes*

Pankratistatin

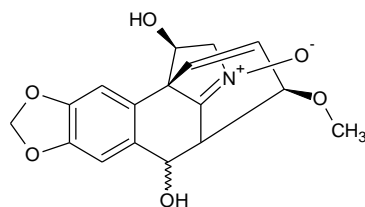
Gracilaminový



Galanthus

Gracilamin

Hostatininový

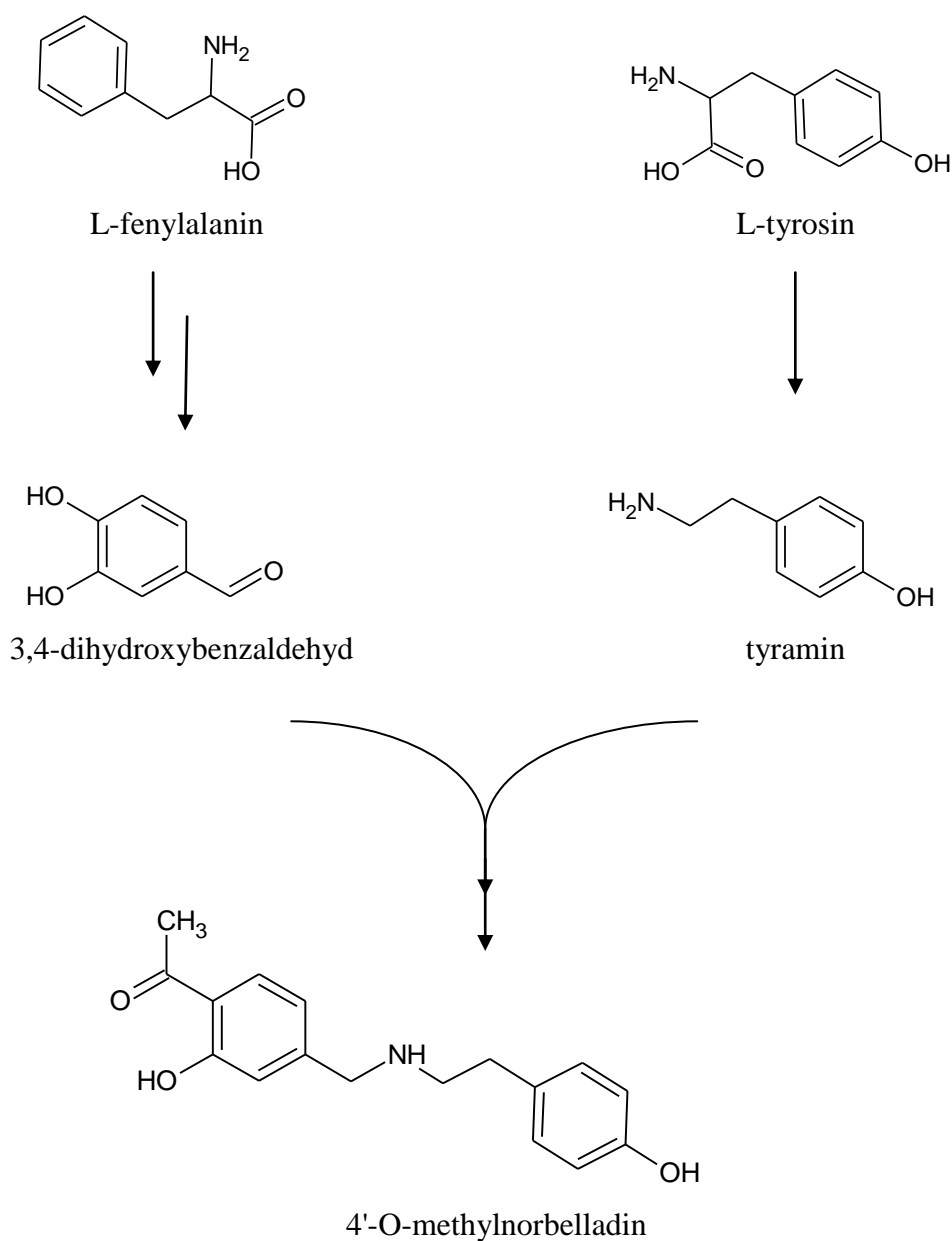


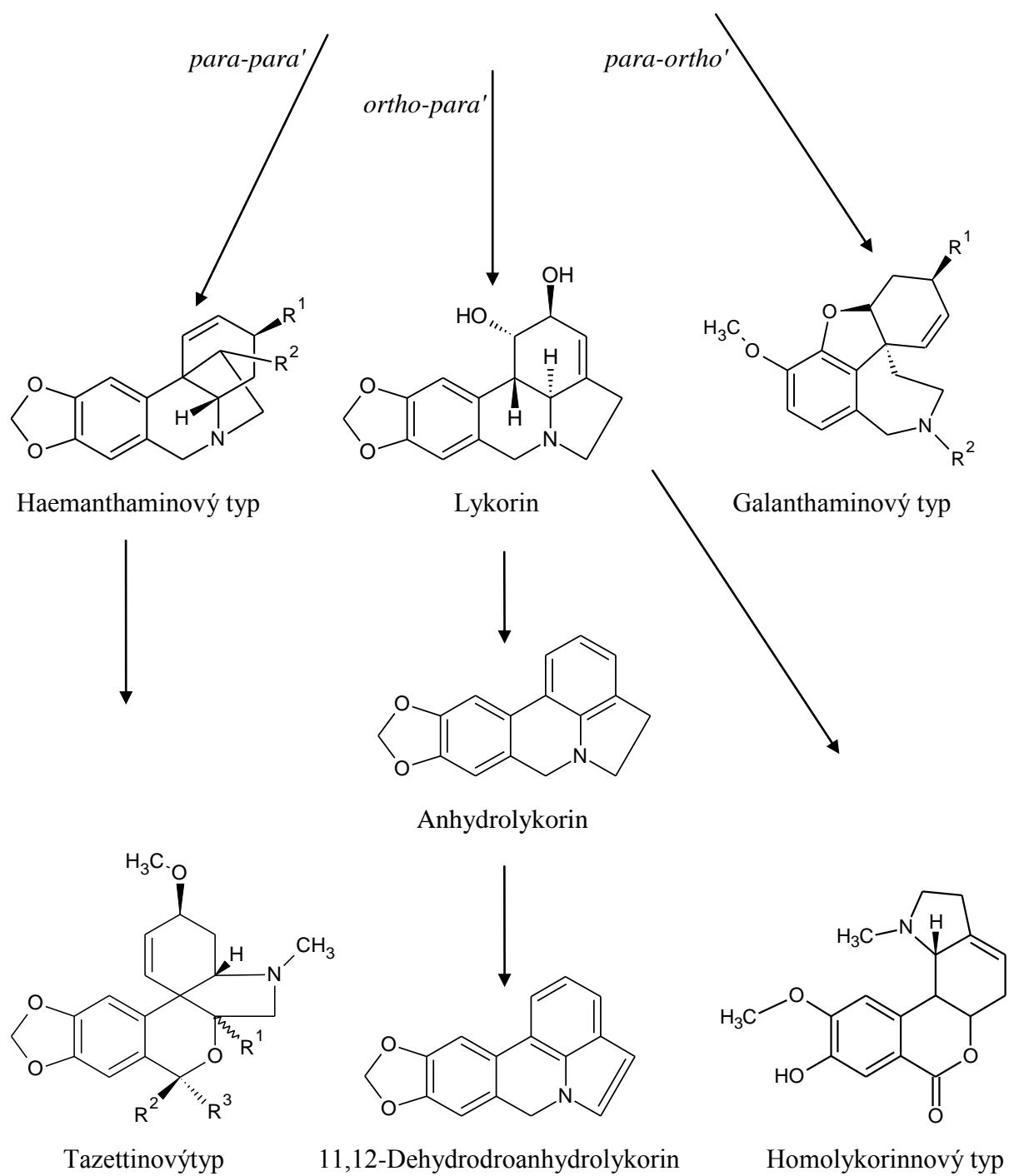
Hosta plantaginea
(Liliaceae)

Hostamin

3.2.2 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Specifickou biosyntetickou cestou více než 400 alkaloidů čeledě Amaryllidaceae je tzv. norbelladinová cesta (Obr. 6). Biosyntéza těchto sloučenin vychází z L-tyrosinu a L-fenylalaninu. L-tyrosin se mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-dihydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vznikne 4'-O-methylnorbelladin. Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spektra vzniká osm základních skeletů: lykorin, galanthamin, tazettin, narciklasin, montanin, lykoreniin, haemantamin a krinin⁵⁰.





Obr. 6 Norbelladinová cesta^{50,39}

3.2.3 Taxonomické zařazení vybraných rodů čeledi Amaryllidaceae, jejich alkaloidy a biologická aktivita

| | |
|-----------|--|
| Říše: | <i>Plantae</i> (rostliny) |
| Podříše: | <i>Tracheobionta</i> (cévnaté rostliny) |
| Oddělení: | <i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné) |
| Třída: | <i>Liliopsida</i> (jednoděložné) |
| Řád: | <i>Asparagales</i> (chřestotvaré) |
| Čeleď: | <i>Amaryllidaceae</i> (amarylkovité) ⁵³ |
| Rod: | <i>Nerine</i> <i>Scadoxus</i> <i>Sprekelia</i> <i>Sternbergia</i> |

3.2.3.1 Rod *Nerine*

Rod *Nerine* je jeden z největších rodů čeledi Amaryllidaceae a zahrnuje cca 30 druhů, z nichž 20 je endemických pro geografickou oblast Jižní Afriky, Lesotha a Swazijska. Další 4 druhy je možné nalézt v oblastech jižní Afriky, přičemž pouze 4 druhy rostou v zimním období, zbývající rostou v létě. V průběhu let byla *Nerine* široce hybridizována⁵⁴. Rostliny tohoto rodu se využívají v tradiční medicíně domorodých kmenů Jižní Afriky, konkrétně kmeny Sotho a Zulu vyráběli odvary z cibulí na léčbu kašle a nachlazení, k léčbě ledvinných a jaterních potíží, k úlevě bolesti zad a jako lék na neplodnost⁵⁵.

Nerine bowdenii

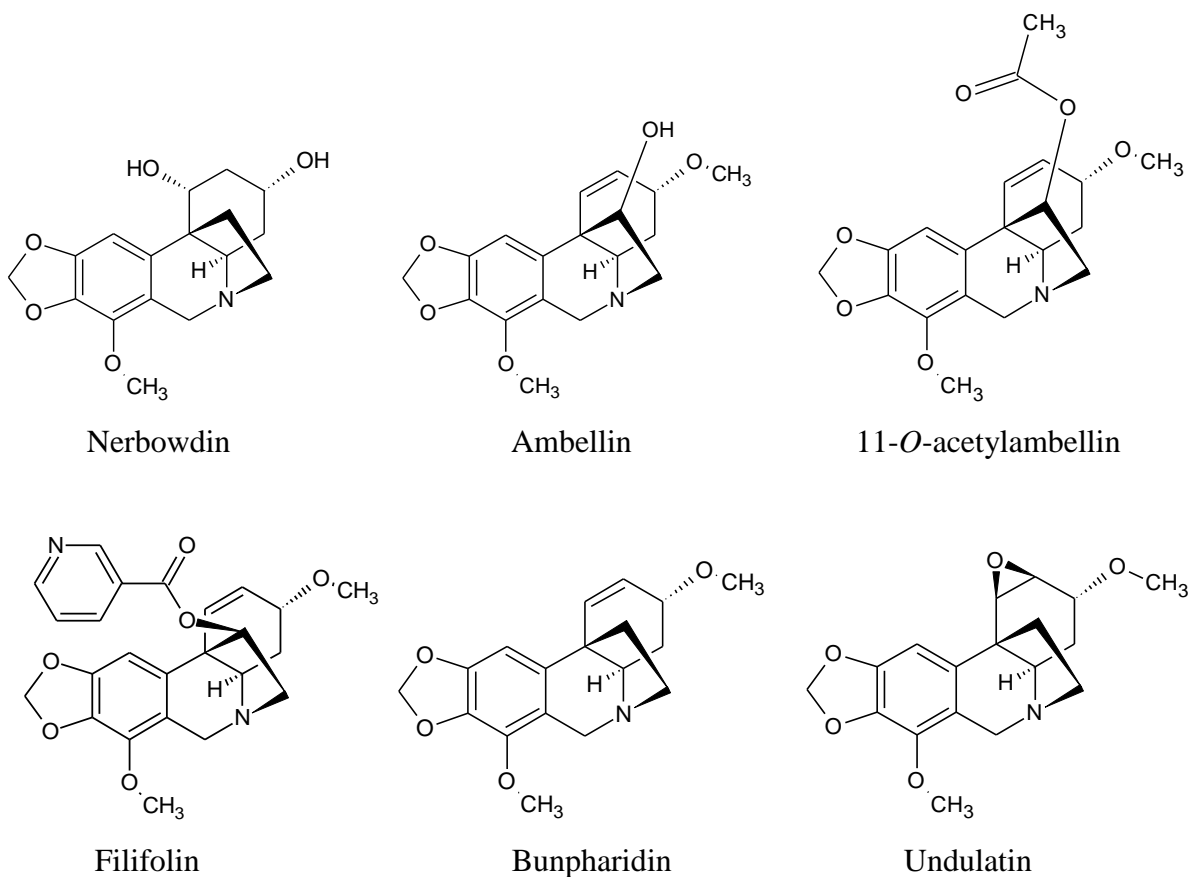
Nejvýznamnějším druhem tohoto rodu je *Nerine bowdenii* (Obr. 7), která je zároveň nejvíce prozkoumaným druhem z fytochemického hlediska. Jedná se o endemický druh rodu Amaryllidaceae, který pochází z KwaZulu-Natal Drakensberg a východní Cape provincie v Jižní Africe a je široce používán jako okrasná rostlina⁵⁶. Kvete na podzim a květy mají především různé odstíny růžové⁵⁷.

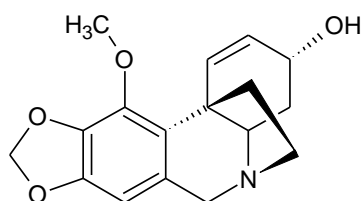
Během tohoto a minulého století bylo provedeno několik studií na *N. bowdenii*. V průběhu těchto studií, zabývajících se fytochemickou stránkou této rostliny, byla izolována celá řada alkaloidů, patřících do několika strukturních typů (Obr. 8). Jako hlavní byly identifikovány ambellin, 11-*O*-acetylambellin, undulatin, buphanisin⁵⁶, belladin, v menším

množství bowdesin, buphanidrin, krinamin, nerbowdin⁵⁸, powellin a ve stopových množstvích 6-hydroxybuphanidrin, 6-hydroxypowellin⁵⁹ a ungeremin⁶⁰. Nutno říci, že všechny studie se doposud zabývaly izolací alkaloidů z cibulí, kde je koncentrace těchto látek nejvyšší.



Obr. 7 *Nerine bowdenii*⁶¹





Powellin

Obr. 8 Struktury některých alkaloidů izolovaných z cibulí *N. bowdenii*^{56,58}

Mezi cibulemi rostlin čeledi Amaryllidaceae, kterých sumární alkaloidní extrakty byly testovány pro inhibiční aktivitu vůči AChE, *Nerine bowdenii* prokázala velmi silnou inhibiční aktivitu⁶⁰.

Některé z izolovaných alkaloidů byly podrobeny testům v čisté formě za účelem stanovení hodnoty IC_{50} na zjištění jejich inhibiční aktivity vůči AChE (Tab. 3). Nejzajímavější inhibiční aktivita byla prokázána u undulatinu ($IC_{50} = 37 \mu M$) a ungereminu ($IC_{50} = 0,35 \mu M$)^{56,60}. V případě ungreminu se jedná o látku kvarterního charakteru, kde je přestup přes hematoencefalickou bariéru velice nevýhodný.

Tab. 3 Hodnoty IC_{50} inhibiční aktivity vůči AChE některých alkaloidů v porovnání se standardem galanthaminem^{56,60}

| Alkaloid | IC_{50} (μM) |
|------------------------------|-----------------------|
| Ambelline | 1270 |
| 11- <i>O</i> -acetylabelline | 1160 |
| Buphanasine | 290 |
| Undulatine | 37 |
| Ungeremine | 0,35 |
| Galanthamine | 4 |

Nerine filifolia

Tato vždyzelená rostlina, s malými cibulemi a úzkými listy (Obr. 9), kvete v průběhu září až listopadu a roste ve východní provincii Cape, Transkei, Swazijsku a Mpumalangu. Doposud bylo izolováno 8 alkaloidů: belladin, 11-*O*-acetylabellin, undulatin jako hlavní složky a jako minoritní složky ambellin, 6 α -hydroxybuphanidrin, *N*-demethylbelladin, 6 α -methoxybuphanadrin a filifolin.

U posledního z alkaloidů, filifolinu, byla měřena *in vitro* jeho biologická aktivita, konkrétně antiprotozoální aktivita proti 4 různým parazitickým protozoím – *Trypanosoma*

cruzi, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* a *Trypanosoma brucei rhodesiense* a cytotoxická aktivita vůči potkaním myoblastům. Výsledky obou testů byli vzhledem k získaným hodnotám nezajímavé⁵⁵.



Obr. 9 *Nerine filifolia*⁶²



Obr. 10 *Nerine undulata*⁶⁷

Nerine undulata

Další zajímavou rostlinou tohoto rodu je *N. undulata*, druh původem z východní Cape provincie v Jižní Africe (Obr. 10). Roste na úpatích, částečně ve stínu a květy jemně růžové barvy rostou hojně na stopkách⁶³. V průběhu dosavadních fytochemických studií byli v rostlině identifikovány alkaloidy – ambellin, undulatin, nerispin, crispin⁶⁴ a nerudine⁶⁵.

Nerine filamentosa

Tato rostlina nebyla doposud z fytochemického hlediska prostudována a není tedy nic známo o jejím alkaloidním profilu.

3.2.3.2 Rod Scadoxus

Tento rod byl původně řazen do rodu *Haemanthus*, ale v roce 1976 se vyčlenil a samostatnil. Jeho zástupce najdeme hlavně v tropické oblasti Afriky, ale rozšiřuje se i do Jižní Afriky. Jednotlivé druhy jsou bohaté na obsah alkaloidů, které jsou silně toxické. Dva druhy jsou používány k přípravě jedů: *S. multiflorus* a *S. cinnabarinus*⁶⁶.

Scadoxus multiflorus

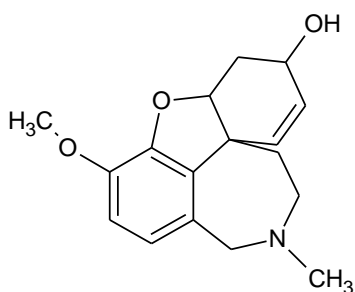
Jedná se o trvalku s vejcovitou cibulí, listy na bázi srostlé k sobě, eliptického tvaru (Obr. 11). Květy jsou v okolíku, červené, šarlatové nebo růžové barvy a plodem jsou malé bobule. Tato rostlina je široce rozšířena v tropické Africe, mimo nejsušších oblastí.

Rostlina se používá nejenom jako lovecký jed, ale i v tradiční medicíně. V Kongu, Gabonu a Nigerii se prášková cibule dává na špatně se hojící rány a v Tanzanii se šťáva vytlačená z cibulí používá k vyvolání porodu u krav. V Indii se extraktem z cibulí, kořenů a květů léčí nachlazení a astma a v Zaire se cibule využívá na léčbu svrabu.

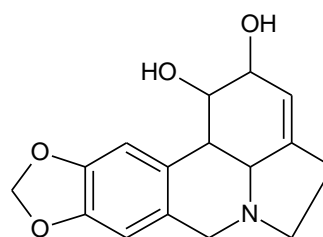
Během fytochemických studií bylo z čerstvých cibulí izolováno několik alkaloidů (Obr. 12) – lykorin, haemanthidin, chlidanthin, hippeastrin, haemultin, montanin, hippadin, galanthamin a 2-*O*-acetylchlidantin⁶⁶.



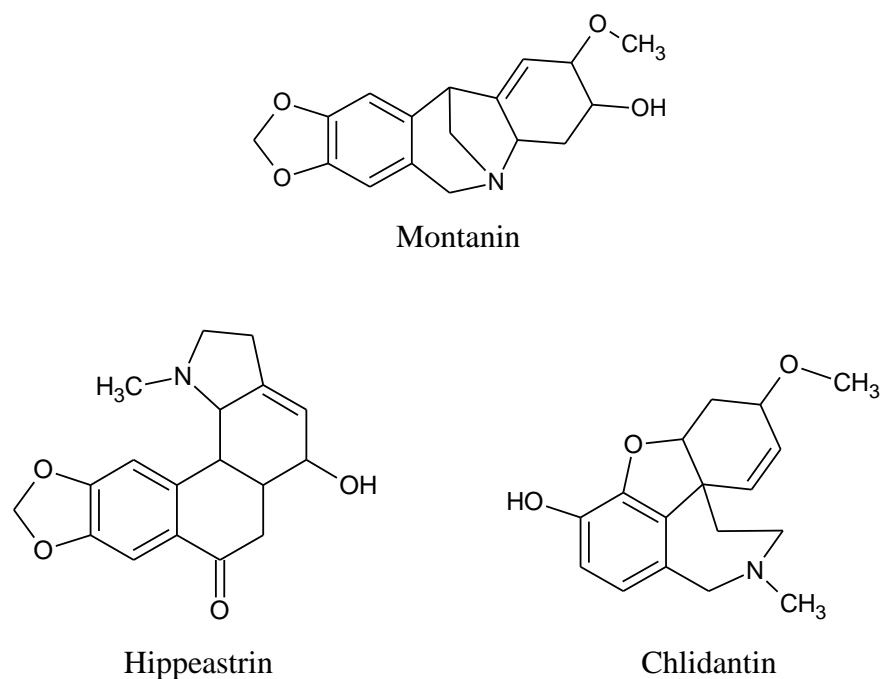
Obr. 11 *Scadoxus multiflorus*⁶⁸



Galanthamin



Lykorin



Obr. 12 Struktury některých alkaloidů izolovaných z cibulí *S. multiflorus*

3.2.3.3 *Rod Sprekelia*

Tento rod zastávají pouze dva druhy rostlin čeledi Amaryllidaceae, původem z Mexika. Nejznámějším druhem je *S. formosissima*⁶⁹.

Sprekelia formosissima

Tato rostlina je rozšířena napříč státem Mexiko a v Guatemale. Ve své domovině roste na skalnatých svazích a stráních, loukách a pastvinách, až do nadmořské výšky 2800m. Jedná se o vytrvalou bylinu, její cibule je kulovitá s prodlouženým krčkem. Listy jsou řemenovité, květní stvoly načervenalé, květy jednotlivé, karmínově červené (Obr. 13). Kvete od dubna do května a plodem je tobolka⁷⁰.

Už v roce 1932 byla tato rostlina studována po fytochemické stránce, ale vzhledem k možnostem té doby, nebyly objeveny žádné alkaloidy ani jiné obsahové látky, navzdory tomu, že jí byla připisována léčebná hodnota⁷¹.

V pozdějších letech již byli vědci úspěšnější a podařilo se izolovat několik alkaloidů, jmenovitě: ismin, heamanthamin, hemanthidin, pretazettin a 3-epimakronin⁷², tazzetin, 8-*O*-demethylmaritidin⁷³.



Obr. 13 *Sprekelia formosissima*⁷⁴

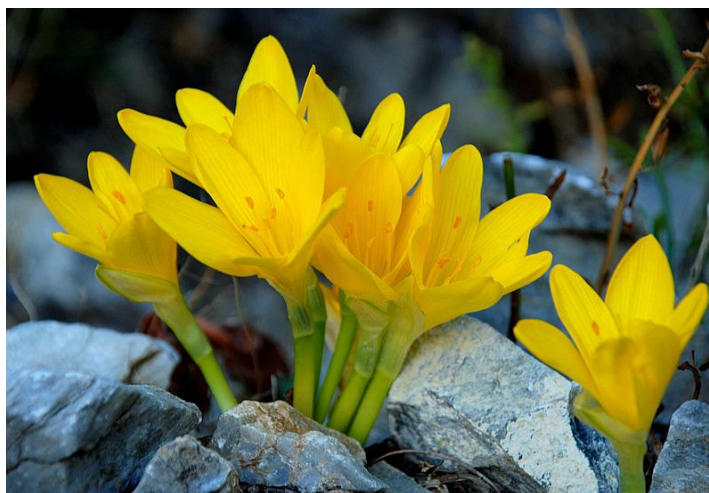
3.2.3.4 Rod *Sternbergia*

Sternbergia je rod čeledi Amaryllidaceae, který lze nalézt podél Středoziemního moře a Blízkého východu. Často roste na kamenných místech. Většina z nich kvete na podzim žlutě⁷⁵. Vyskytuje se asi ve 12 druzích. Má nevelké kulovité cibulky, obalené hnědými až černými ochrannými šupinkami. Květy jsou nejčastěji jednotlivé, nálevkovité, se zaoblenými okvětními lístky, žluté⁷⁶.

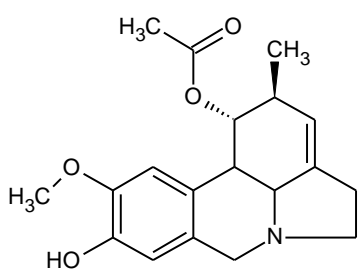
Největší pozornost se zatím upírala na druhy *S. fisheriana*, *S. clusiana* a *S. lutea*, především pro jejich alkaloidní obsahové látky. Nicméně u *S. fisheriana* byly studovány analgetické, protizánětlivé a hepatoprotektivní účinky alkaloidu lykorinu⁷⁷, u *S. clusiana* se testovali analgetické⁷⁹, antioxidační a antimikrobní účinky, spolu s celkovým obsahem fenolické složky⁷⁸.

Sternbergia lutea

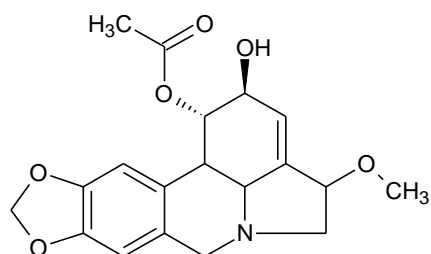
Tato rostlina je domácí ve Středomoří (Obr. 14), v západní Asii od Íránu až po Pamír⁷⁶. V 70. letech se z této rostliny podařilo izolovat 6 alkaloidů – lykorin, tazzetin, haemanthamin, galanthamin a galanthin a o 10 let později identifikovali vědci další tři alkaloidy – hippamin a nové alkaloidy - sternbergin, který je strukturně podobný pseudolykorinu⁸⁰, a lutessin⁸¹ (Obr. 15). Za použití extrakce a frakcionace jednotlivých frakcí prostřednictvím chromatografie byl izolován další alkaloid, a to 11-hydroxyvittatin, který již byl předtím izolován ze dvou druhů čeledi Amaryllidaceae – *Pancratium maritimum* a *Rhodophiala bifida*⁸⁰.



Obr. 14 *Sternbergia lutea*⁸²



Sternbergin



Lutessin

Obr. 15 Struktury některých alkaloidů z rostliny *S. lutea*

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předeček (asi 5%; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při 40 °C za sníženého tlaku.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla

Diethylether, p.a. (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný metanolem, p.a. (Penta)

Ethylacetát, p.a. (Penta)

Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

4.2.2 Chemikálie

Amoniak, 25% vodný roztok, p.a. (Lachema)

Kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lachema)

4.3 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza

4.3.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostlin *Nerine undulata*, *N. filifolia*, *N. filamentosa*, *Scadoxus multiflorus*, *Sprekelia formosissima* a *Sternbergia lutea* byly zakoupeny od komerčních prodejců Lukon glads s.r.o. (Sadská, ČR) a Rare Plants (UK). Verifikace byla provedena doc. RNDr. L. Opletalem, CSc. a dokladové rostliny jsou uloženy v herbáři na FaF UK HK.

4.3.2 Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu

Rozmleté čerstvé cibule (3×15 g) byly $3\times$ extrahovány ethanolom (50 ml) při pokojové teplotě 48 hodin. Směs se poté zfiltrovala a rozpouštědlo se pod sníženým tlakem odpařilo. Vzniklý odparek se rozpustil v 10 ml 2% HCl. Po odstranění neutrálních složek za pomoci vytřepávání s diethyletherem (3×15 ml), byl k extraktu přidán 25% vodný roztok amoniaku na docílení pH kolem 10. V další fázi byl extrakt vytřepáván ethylacetátem (3×15 ml). Z každého alkaloidního extraktu byl odebrán vzorek o hmotnosti cca 10 mg, který byl odpařen do sucha, vysušen v exsikátoru a následně použit na biologické testy. Zbytek alkaloidního extraktu byl odpařen a pro přípravu roztoku k GC/MS analýze byla část rozpuštěna v metanolu k získání potřebné koncentrace 10 mg/ml^{83,84}.

4.3.3 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

K identifikaci alkaloidů z rostlin *Nerine undulata*, *Scadoxus multiflorus* a *Sprekelia formosissima* bylo použito plynového chromatografu (Focus Thermo Scientific, USA) se split/splitless násřikem (s poměrem 1:10; 280° C) a hmotnostního spektrometru (200°C, GC-MS MD 800 Fisons, Manchester, UK). K separaci jednotlivých složek se použila kolona DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplotní program byl: 100 - 180°C s nárůstem 15°C/min, 1 min na 180°C, 180 – 300°C při 5°C/min a po dobu 5 min na 300°C, škála detekce m/z 40-600. Průtok nosného plynu (helium) 1ml/min.

Alkaloidy byly identifikovány pomocí porovnávání jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 08 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty v literatuře a se standardy izolovaných v naší laboratoři (galanthamin, haemanthamin, tazzetin)⁸³.

Alkaloidní extrakty rostlin *Nerine filifolia*, *Nerine filamentosa* a *Sternbergia lutea* byly analyzovány pomocí GCMS-QP2010 Plus system (Shimadzu, Japan) se split násřikem (1:5; 270° C). Separace proběhla v koloně HP-5MS UI (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m; Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplotní program od 150° C, nárůst o 3° C/min na 300° C, po dobu 15 min. Detekční škála byla m/z 40-600 a teplota detektoru 200° C. Průtok nosného plynu (helium) byl 3 ml/min. Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány stejným způsobem jako v předchozím případě⁸⁴.

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

4.4.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Chemikálie:

10mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

10mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenufosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

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

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

Galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erythrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.4.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.4.3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37 °C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

4.4.4 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta⁸⁵. Plazma (HuBuChE) byla oddělena z krve pomocí centrifugace při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrém.

4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)⁸⁶. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galataminem (IC₅₀ HuAChE = 1,710 ± 0,065 μM, HuBuChE = 42,30 ± 1,30 μM), huperzinem A (IC₅₀ HuAChE = 0,033 ± 0,001 μM, HuBuChE >1000 μM). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce,

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

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů

4.5.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení antioxidační aktivity

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, (Sigma-Adrich)

Kvercetin, (Sigma-Adrich)

Kyselina askorbová, (Sigma-Aldrich)

Trolox, (Sigma-Adrich)

4.5.2 4.6.1 Přístroje použité pro stanovení antioxidační aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.5.3 4.6.2 Stanovení antioxidační aktivity (EC_{50})

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC_{50}), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem $EC_{50} = 11,11 \pm 0,25 \mu\text{M}$, kys. askorbovou $EC_{50} = 51,61 \pm 3,21 \mu\text{M}$ a troloxem $EC_{50} = 20,45 \pm 1,31 \mu\text{M}$.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Nerine filifolia* Baker a jeho GC/MS analýza

Rod *Nerine* je druhý největší v čeledi Amaryllidaceae a zahrnuje přibližně 30 druhů. Jedná se o cibulovitou, na podzim kvetoucí skupinu rostlin, jejíž druhy rostou především v subtropických až tropických oblastech.

Předchozí fytochemická studie provedená na druhu *N. filifolia*, vedla k izolaci 8 alkaloidů, kde jako hlavní složky byly identifikovány belladin, 11-*O*-acetylbambinin a undulatin⁵⁵. Na základě retenčního času jednotlivých složek, hmotnostních spekter a jejich porovnáváním s údaji uvedenými v literatuře a se standardy se v našem alkaloidním extraktu podařilo identifikovat 7 sloučenin (Tab. 4). Jako hlavní složka byl identifikován alkaloid homolykorinového typu masonin a další komponenty byly určeny jako *N*-demethylmasonin, což je *N*-demethylovaný alkaloid lykoreninového typu a alkaloid krininového typu karanin⁸⁴.

Masonin a *N*-demethylmasonin již byly identifikovány prostřednictvím GC/MS v rostlině *Galanthus elwesii*⁹² a izolovány z některých druhů rodu *Narcissus*^{93,94}.

Chromatografický záznam alkaloidního profilu a strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů jsou zobrazeny na následujících obrázcích (Obr. 16 a 17).

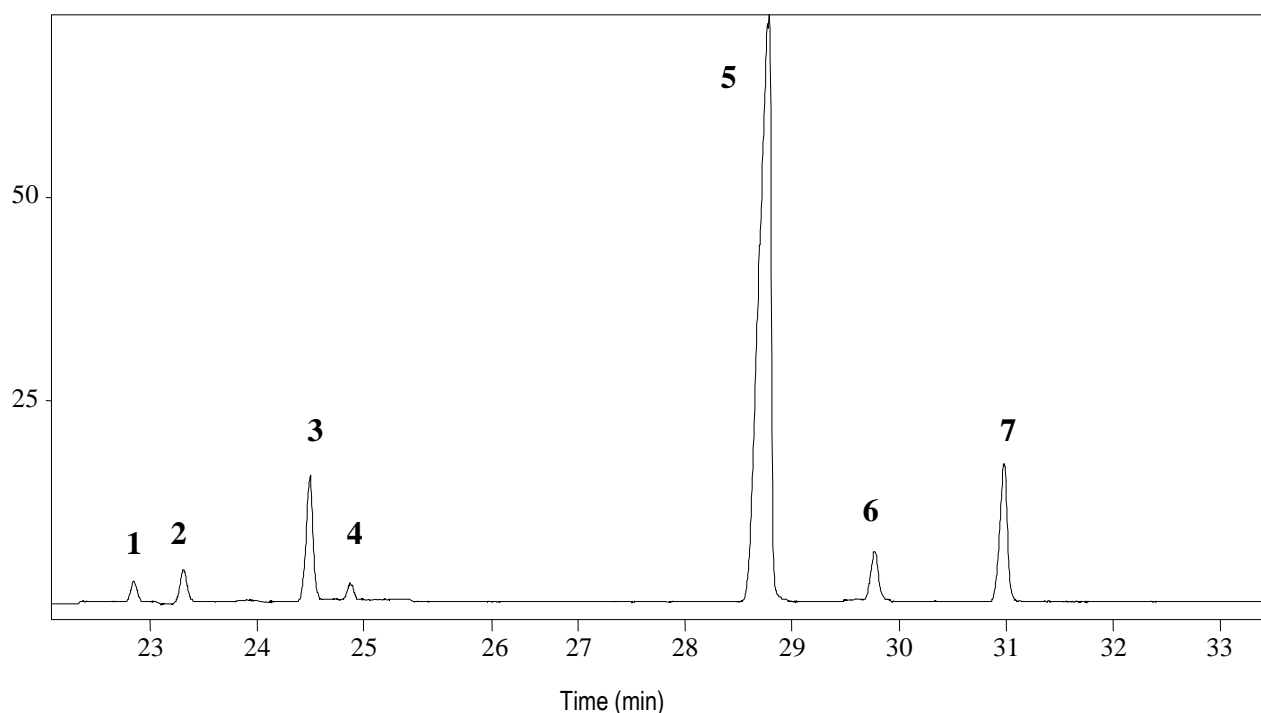
Tab. 4 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS a popis jejich hmotnostních spekter

| Sloučenina | RT ^a (min) | [M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita) | % | Reference pro MS |
|-----------------------------|--------------------------|---|----|-----------------------|
| 1 <i>O</i> -Methylodulin | 22,85 | 315(<1), 284(2), 250(1), 175(10), 109(100) | 1 | [18] |
| 2 Krinin | 23,38 | 271(100), 254(8), 242(8), 228(25), 216(14), 199(48), 187(43) | 2 | NIST 08 |
| 3 Karanin | 24,5 | 271(86), 270(46), 252(52), 250(10), 240(12), 227(48), 226(100), 215(5) | 9 | NIST 08 |
| 4 Acetylkaranin | 24,88 | 313(80), 270(5), 253(20), 252(95), 250(15), 240(10), 225(40), 226(100) | 1 | NIST 08 |
| 5 Masonin | 28,79 | 299(1), 190(2), 162(4), 134(1), 109(100), 108(23), 94(4), 82(2) | 71 | NIST 08 |
| 6 Lykorin | 29,79 | 287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100) | 4 | NIST 08, standardy |
| 7 <i>N</i> -demethylmasonin | 30,98 | 285(<1), 162(2), 134(1), 115(1), 95 (100) | 11 | [18] |

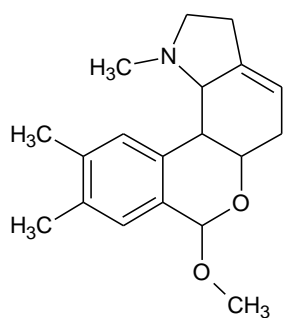
^a podmínky pro GC/MS analýzu jsou popsány v experimentální části

Rostlina *N. filifolia* vykázala zajímavou inhibiční aktivitu vůči HuAChE (humánní acetylcholinesteráze) s hodnotou IC_{50} $18,54 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$. Inhibiční aktivita nejspíše nebude spojená s alkaloidy homolykorinového typu, neboť doposud testované alkaloidy tohoto typu byly zcela neaktivní. Z tohoto pohledu jsou naše výsledky zajímavé a dá se říci, že jsou v rozporu s předchozími studii. Za účelem identifikace látky, která je zodpovědná za inhibiční aktivitu alkaloidního extraktu, je potřeba rostlinu podrobit fytochemické studii a látky izolovat v čistém stavu. Ty poté testovat na jejich inhibiční aktivitu. Dalším problémem v rozdílných výsledcích může být použití jiného zdroje AChE, kdy v předchozích pracích byla použita komerčně dostupná AChE z elektrického úhoře, zatímco v našich studiích se využívala humánní AChE^{95,101}.

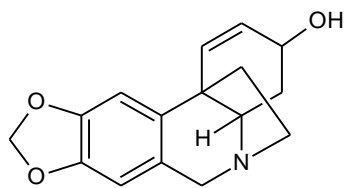
Hodnota inhibiční aktivity vůči HuBuChE (humánní butyrylcholinesteráza) IC_{50} byla $58,55 \pm 1,25 \mu\text{g/ml}$ ⁸⁴. Tato aktivita byla srovnatelná s použitým standardem galanthaminem.



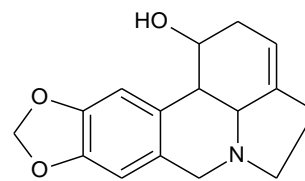
Obr. 16 Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Nerine filifolia*



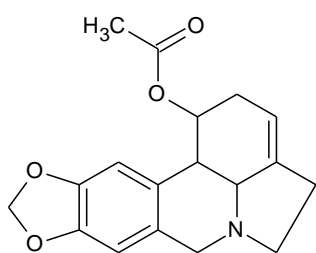
1 *O*-methylodulin



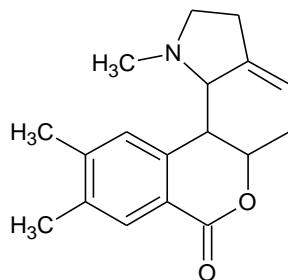
2 Krinin



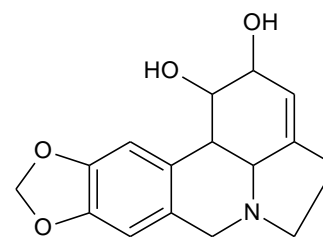
3 Karanin



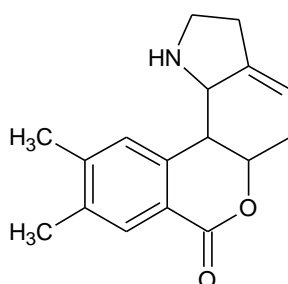
4 Acetylkaranin



5 Masonin



6 Lycorin



7 *N*-Demethylmasonin

Obr. 17 Strukturální vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibulí *Nerine filifolia*

5.2 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Nerine undulata* (L.) Herb. a jeho GC/MS analýza

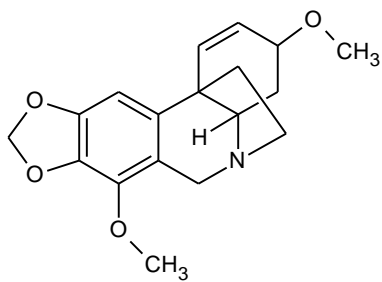
Předchozí fytochemické studie provedené na *N. undulata* vedly k izolaci a identifikaci pouze 3 alkaloidů lykorinu, ambellinu a undulatinu⁶⁴. Jako hlavní složky alkaloidního extraktu z cibulí *N. undulata* byly identifikovány alkaloidy krininového typu: undulatin a buphanamin a dva alkaloidy, které se nám prozatím nepodařilo identifikovat, protože jejich spektra nebyla obsažena v komerčních knihovných spekter ani popsána v literatuře (Tab. 5, Obr. 18 a 19). Tyto látky se nám nepodařilo identifikovat ani na základě porovnávání podobných spekter. Nejspíše se bude jednat o látky doposud nepopsané. Alkaloidní extrakt vykazoval slibnou aktivitu vůči lidské acetylcholinesteráze (HuAChE), kde získaná hodnota

IC₅₀ byla 14,30 ± 1,20 µg/ml. Údaje v literatuře říkají, že u rostlin čeledi Amaryllidaceae je inhibiční aktivita spojena hlavně s galanthaminovým a lykorinovým typem alkaloidů^{95,96}. Sloučeniny lykorinového typu jsou slabší inhibitory než alkaloidy galanthaminového typu a jejich aktivita je spojena se substitucí v poloze C-1 a C-2⁹⁵. Krininový typ alkaloidů vykazuje pouze slabou inhibiční aktivitu vůči AChE. Na základě těchto údajů a našich výsledků je možné, že zajímavá inhibiční aktivita vůči HuAChE *N. undulata* je spojena s neidentifikovanými sloučeninami (A9 a A12), ale abychom toto mohli potvrdit je nutné tyto sloučeniny izolovat. Extrakt z *N. undulata* vykazoval i zajímavou inhibiční aktivitu vůči HuBuChE, jejíž hodnota IC₅₀ je 33,9 ± 1,9 µg/ml. Jak již bylo zmíněno, BuChE hraje důležitou roli v pozdějších stádiích AD, a proto je nutné se zaměřit na hledání látek s duální inhibiční aktivitou. Doposud bylo testováno velmi úzké portfolio látek na inhibiční aktivitu vůči HuBuChE a tudíž nemohou být vysloveny žádné strukturní zákonitosti hrající významnou roli v této aktivitě⁸³.

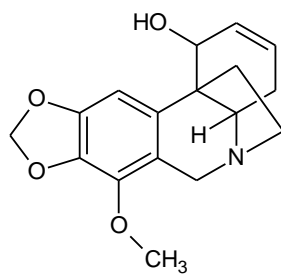
Tab. 5 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS a popis jejich hmotnostních spekter

| Sloučenina | RT ^a (min) | [M ⁺] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita) | % | Reference pro MS |
|--------------------|-----------------------|---|----|------------------|
| 1 Buphanidin | 24,05 | 315(100), 300(26), 287(30), 272(10), 260(45), 245(60), 231(30), 282(22) | 5 | NIST 08, [22] |
| 2 Buphanamin | 24,2 | 301(100), 286(12), 284(14), 272(14), 256(18), 231(25), 218(18), 204(18) | 11 | NIST 08 |
| 3 Flexinin | 24,95 | 287(55), 258(100), 229(15), 228(20), 215(30), 215(25), 187(45), 186(15), 175(55), 173(30), 143(70), 115(85) | 1 | NIST 08, [23] |
| 4 Undulatin | 26,32 | 331(100), 316(6), 302(9), 300(6), 286(20), 272(5), 260(18), 258(40) | 56 | [22] |
| 5 Ambellin | 26,54 | 331(100), 316(5), 299(30), 287(55), 270(25), 260(50), 257(35), 255(23), 241(27) | 3 | NIST 08 |
| 6 A9 ^c | 26,65 | 373(90), 314(72), 299(38), 284(20), 270(20), 254(54), 242(50), 226(38), 216(20), 115(25), 43(100) | 10 | |
| 7 Krinamidin | 27,67 | 317(75), 288(100), 274(5), 259(22), 258(25), 243(28), 244(30), 230(25), 217(40), 205(40) | 2 | NIST 08 |
| 8 A12 ^c | 28,85 | 329(100), 314(18), 300(8), 286(12), 270(6), 231(28), 218(15), 204(20), 190(10) | 9 | |
| 9 Bowdesin | 28,99 | 403(82), 344(80), 288(75), 284(50), 272(40), 258(20), 244(28), 230(40), 217(42), 189(28), 173(50), 43(100) | 3 | NIST 08 |

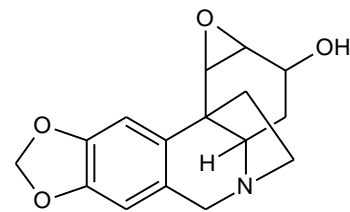
^a podmínky pro GC/MS analýzu jsou popsány v experimentální části; ^c nebylo identifikováno



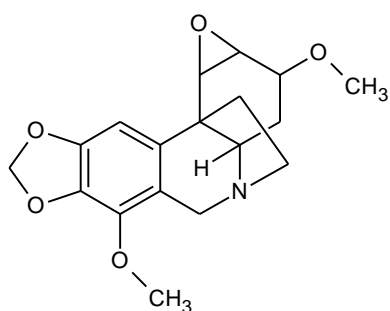
1 Buphanidin



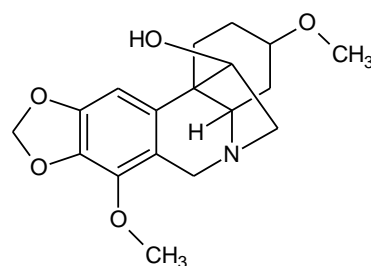
2 Buphanamin



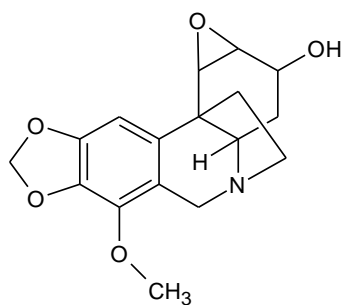
3 Flexinin



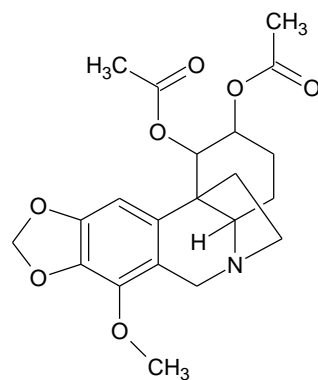
4 Undulatin



5 Ambellin

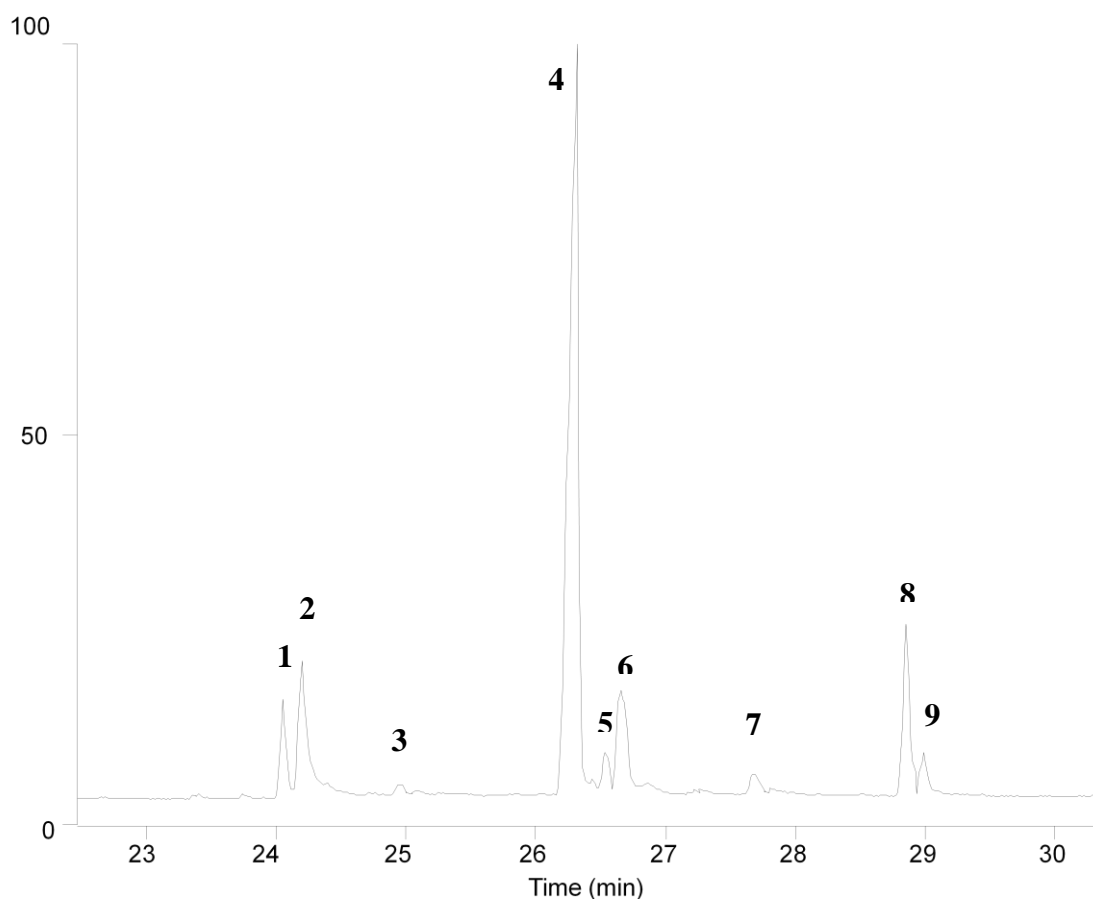


7 Crinamidin



9 Bowdesin

Obr. 18 Strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibulí rostliny *Nerine undulata*



Obr. 19 Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Nerine undulata*

5.3 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Nerine filamentosa* W. F. Barker a jeho GC/MS analýza

Alkaloidnímu extraktu *N. filamentosa* dominovaly 3 alkaloidy krininového typu: undulatin, buphanamin a ambellin a 1 alkaloid lykorinového typu, který byl předběžně identifikován jako acetylparkamin (Tab. 6, Obr. 20 a 21). Parkamin a acetylparkamin byly identifikovány porovnáním jejich MS s již známými sloučeninami stejného strukturního typu (karaninu, acetylkaraninu, falkatinu a acetylfalkatinu), které jsou dostupné v knihovně NIST a popsány v literatuře. Parkamin má spektrum typické pro alkaloidy lykorinového typu substituované na C-1 i C-2⁹⁷ a v hmotnostním spektru byl zaznamenán stejný fragmentační mechanismus jako u karaninu a falkatinu. Struktura parkaminu byla stanovena již v 60. letech minulého století pomocí chemických metod^{65,98}, ale nikde v literatuře nebylo možné nalézt NMR, MS ani jiné strukturní údaje, které by jednoznačně vedly k identifikaci látky. Za účelem potvrzení této struktury je potřeba látku izolovat a podrobit strukturním studiím [NMR (nukleární magnetická rezonance), MS]⁸⁴.

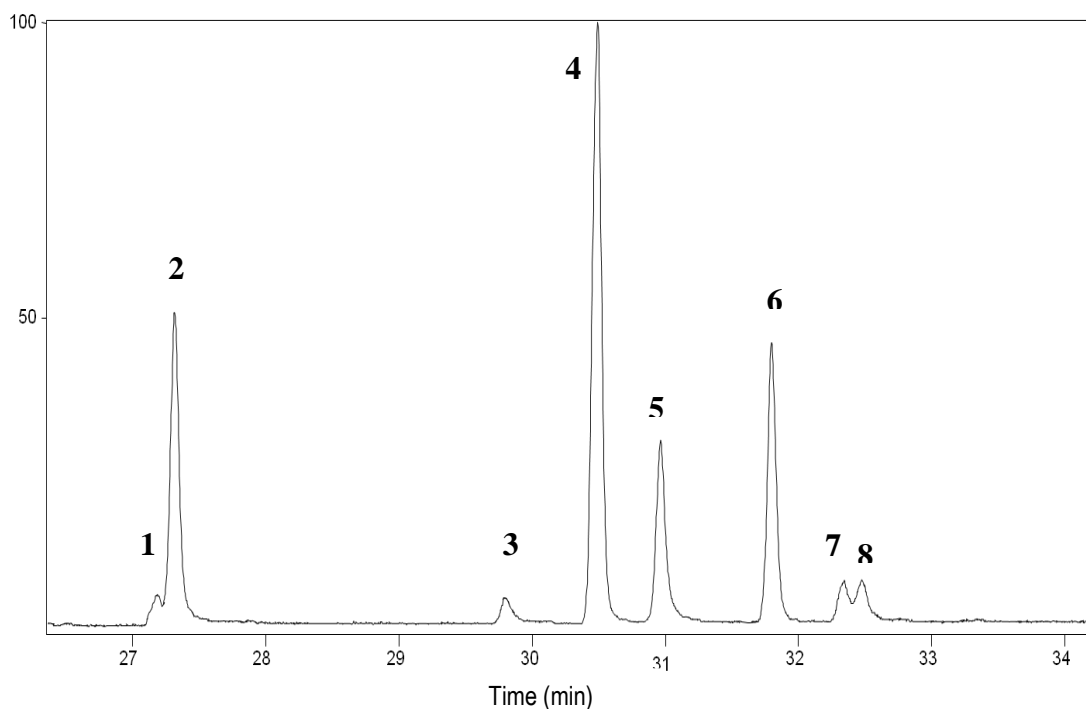
Alkaloidní extrakt z této rostliny vykazoval slibnou inhibiční aktivitu vůči HuAChE s hodnotou $IC_{50} 21,57 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$. Vzhledem k tomu, že v extraktu dominují alkaloidy kininového typu, které jsou dle literárních údajů slabé inhibitory, je získaná aktivita poměrně zajímavá a nejspíše bude potřeba izolovat a testovat mnohem větší škálu látek. Další možností je, že v inhibici může hrát roli i kooperace dvou nebo více látek.

Tab. 6 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS a popis jejich hmotnostních spekter

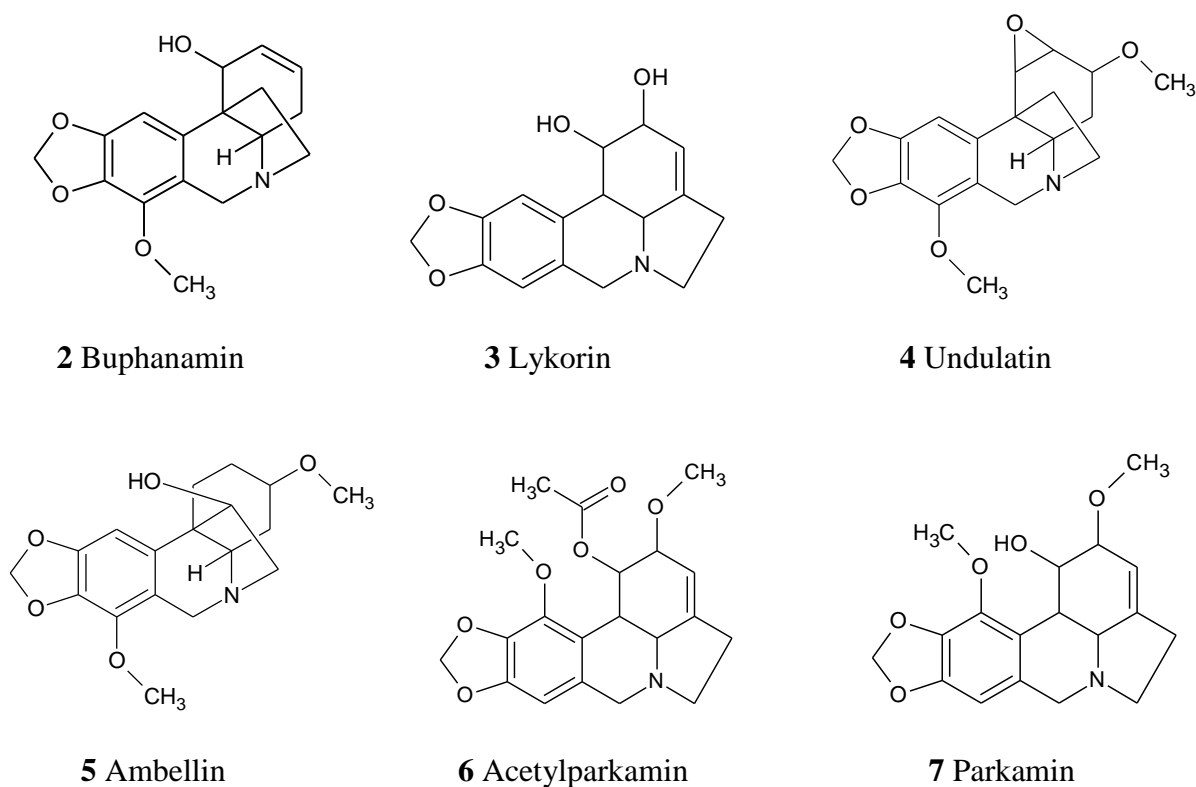
| Sloučenina | RT ^a (min) | [M ⁺] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita) | % | Reference pro MS |
|--------------------|--------------------------|---|----|---|
| 1 A9 ^c | 27,17 | 343(40), 315(100), 300(30), 284(60), 260(27), 245(65), 231(32), 215(24) | 2 | |
| 2 Buphanamin | 27,31 | 301(100), 286(12), 284(14), 272(14), 256(18), 231(25), 218(18), 204(18) | 20 | NIST 08 |
| 3 Lykordin | 29,79 | 287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100) | 2 | NIST 08, standardy |
| 4 Undulatin | 30,48 | 331(100), 316(6), 302(9), 300(6), 286(20), 272(5), 260(18), 258(40) | 45 | NIST 08, standardy |
| 5 Ambellamin | 30,96 | 331(100), 316(5), 299(30), 287(55), 270(25), 260(50), 257(35), 255(23), 241(27) | 13 | NIST 08, standardy |
| 6 Acetylparkamin | 31,79 | 373(80), 313(18), 312(60), 287(77), 286(100), 282(20), 256(10) | 11 | identifikace porovnáním s MS známé struktury |
| 7 Parkamin | 32,32 | 331(76), 312(60), 287(70), 286(100), 282(17), 256(17), 44(54) | 3 | identifikace porovnáním s MS známé struktury |
| 8 A22 ^c | 32,47 | 331(110), 317(65), 288(100), 258(20), 245(32), 217(40), 205(35), 189(20), 173(36) | 3 | |

^a podmínky pro GC/MS analýzu jsou popsány v experimentální části; ^c nebylo identifikováno

V porovnání s předchozími studii však extrakt z *N. filamentosa* měl jednu z nejlepších inhibičních aktivit vůči HuBuChE, jejíž hodnota IC_{50} se pohybovala kolem $13,00 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$. Podobné hodnoty vykazoval i alkaloidní extrakt z rostliny *N. bowdenii*¹⁰⁰, jejíž alkaloidní profil se hodně podobá profilu *N. filamentosa*. Nicméně, abychom určili, která látka, nebo skupina látek je zodpovědná za tuto velmi slibnou aktivitu vůči HuBuChE, musí být provedeno testování izolovaných a identifikovaných jednotlivých alkaloidů⁸⁴.



Obr. 20 Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Nerine filamentosa*



Obr. 21 Strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibulí *Nerine filamantosa*

5.4 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Scadoxus multiflorus* (Martyn) Raf. a jeho GC/MS analýza

Tato rostlina, domácí v Africe, byla již v minulosti podrobena fytochemické studii, při níž se podařilo izolovat alkaloidy – lykorin, haemanthidin, chlidanthin, hippeastrin, haemultin, montanin, hippadin, galanthamin a 2-*O*-acetylchlidantin⁶⁶.

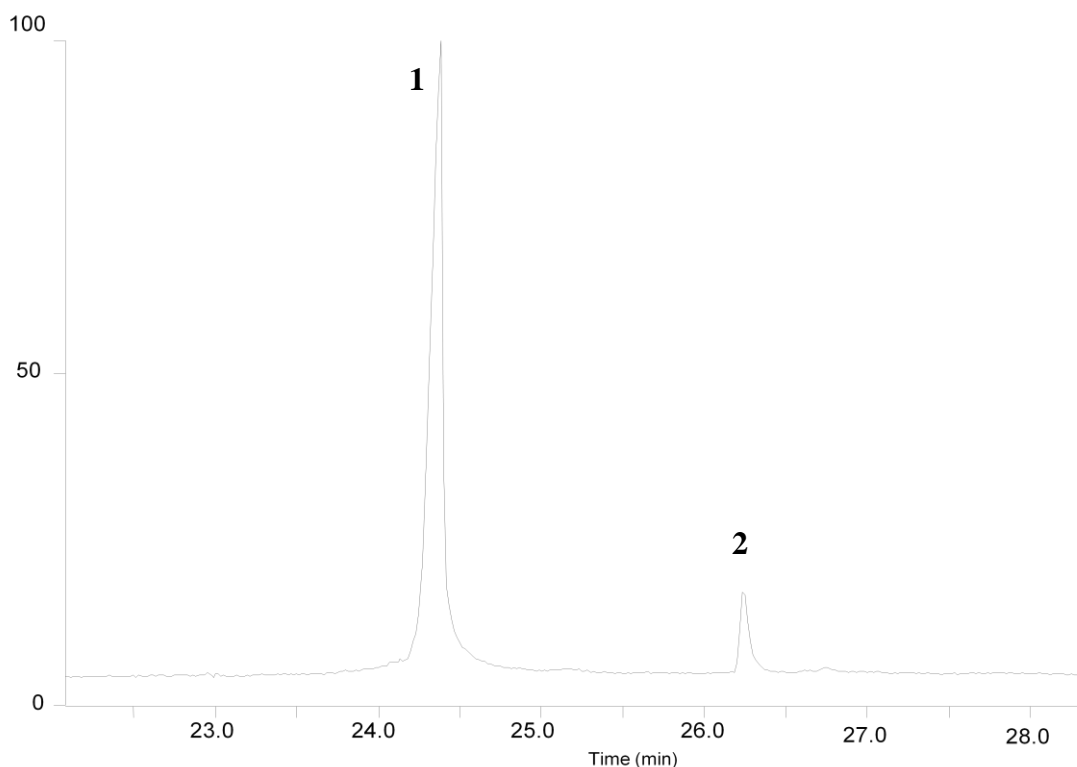
V našem alkaloidním extraktu *S. multiflorus* se podařilo identifikovat pouze dva alkaloidy a to montanin a undulatin (Tab. 7), jejichž chromatografický záznam a strukturní vzorce jsou zobrazeny na Obr. 22 a 23.

Alkaloidní extrakt této rostliny vykazoval pouze slabou inhibiční aktivitu vůči HuAChE, s hodnotou $IC_{50} 313,5 \pm 10,5 \mu\text{g/ml}$, hodnota inhibiční aktivity vůči HuBuChE byla prakticky stejná s použitým standardem galanthaminu a činila $IC_{50} 54,3 \pm 3,1 \mu\text{g/ml}$ ⁸³. Na základě těchto výsledků je tato rostlina pro nás spíše nezajímavá z ohledu fytochemické studie, v rámci které je v našem zájmu izolovat co nejširší spektrum látek.

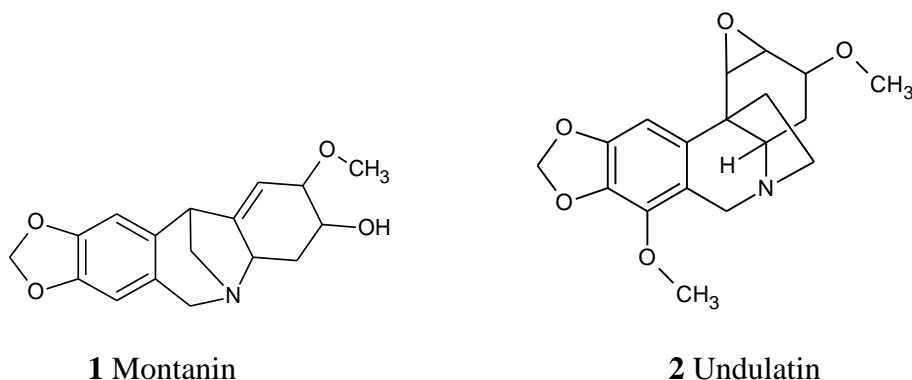
Tab. 7 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS a popis jejich hmotnostních spekter

| Sloučenina | RT ^a (min) | [M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita) | % | Reference pro MS |
|-------------|-----------------------|--|----|------------------|
| 1 Montanin | 24,39 | 301(100), 270(75), 257(30), 252(20), 223(15) | 92 | NIST 08, [16] |
| 2 Undulatin | 26,32 | 331(100), 316(6), 302(9), 300(6), 286(20), 272(5), 260(18), 258(40) | 8 | [22] |

^a podmínky pro GC/MS analýzu jsou popsány v experimentální části



Obr. 22 Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Scadoxus multiflorus*



Obr. 23 Strukturální vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibulí *Scadoxus multiflorus*

5.5 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Sprekelia formossisima* (L.) Herb. a jeho GC/MS analýza

Alkaloidnímu profilu (Tab. 8) této rostliny dominoval tazettin a haemanthamin, v minoritním množství byli identifikováni undulatin a 3- epimakronin (Obr. 24 a 25).

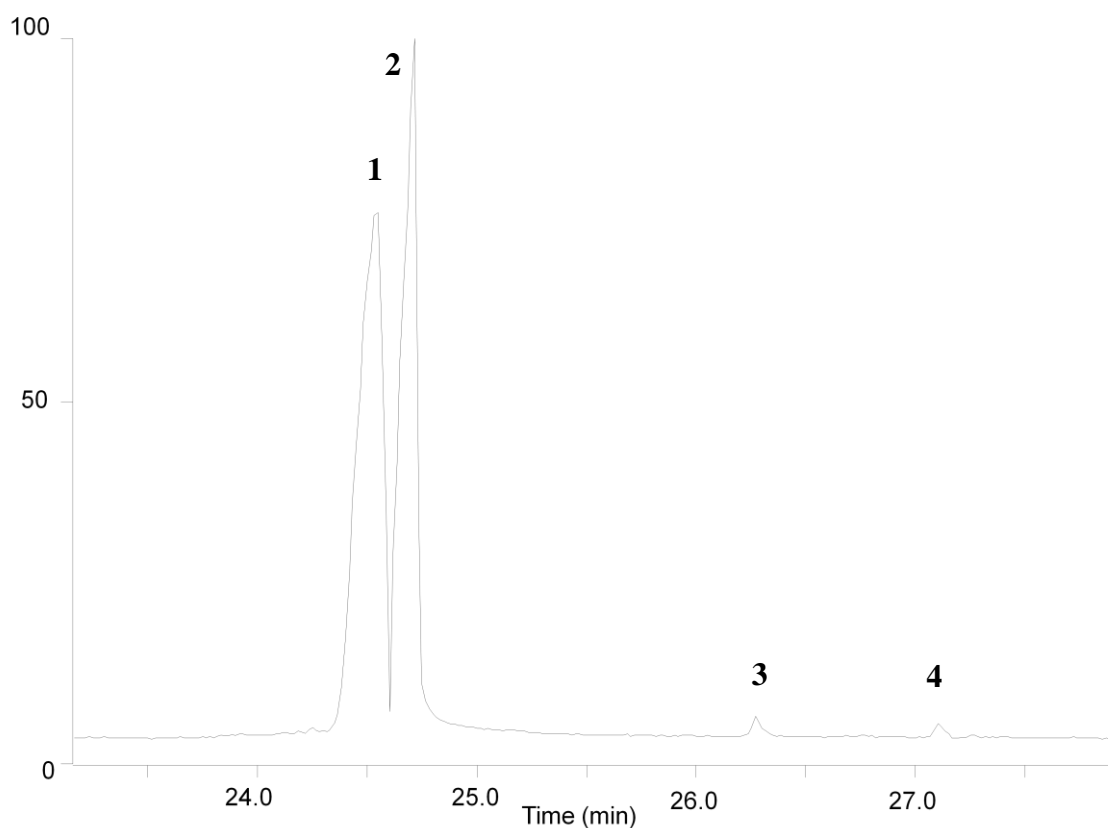
Inhibiční aktivita vůči HuAChE s hodnotou $IC_{50} 209,70 \pm 5,60 \mu\text{g/ml}$ nebyla nijak zajímavá, navíc extrakt nevykázal žádnou inhibiční aktivitu vůči HuBuChE a na základě těchto výsledků je pro nás tato rostlina z hlediska fytochemické práce opět nezajímavá⁸³. Navíc 3 látky identifikované v alkaloidním profilu již byly izolovány a testovány v naší

laboratoři. Jejich aktivity kopírují výsledky získané v této analýze, tudíž jsou neaktivní a nepoužitelné v terapii AD (nepublikované výsledky).

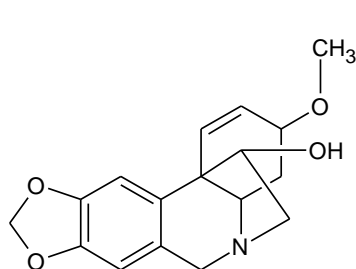
Tab. 8 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS a popis jejich hmotnostních spekter

| Sloučenina | RT ^a (min) | [M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita) | % | Reference pro MS |
|-----------------|-----------------------|--|-----|----------------------------|
| 1 Haemanthamin | 24,55 | 301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15) | 54 | NIST 08, [16] ^d |
| 2 Tazettin | 24,72 | 331 (20), 316 (20), 298 (25), 247 (100), 230 (10) | 45 | NIST 08, [16] ^d |
| 3 Undulatin | 26,32 | 331(100), 316(6), 302(9), 300(6), 286(20), 272(5), 260(18), 258(40) | < 1 | [22] |
| 4 3-Epimakronin | 27 | 329 (30), 314 (25), 245 (100), 225 (15), 201 (80), 139 (10) | < 1 | NIST 08, [16] |

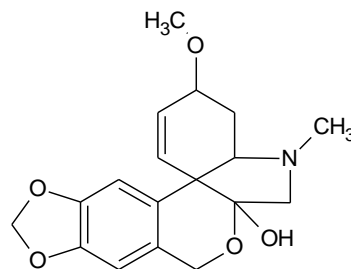
^a podmínky pro GC/MS analýzu jsou popsány v experimentální části



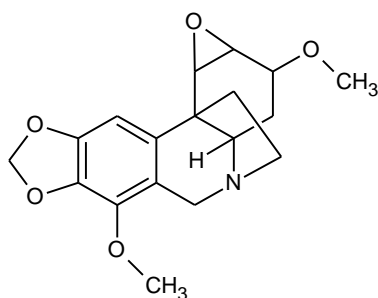
Obr. 24 Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Sprekelia formossisima*



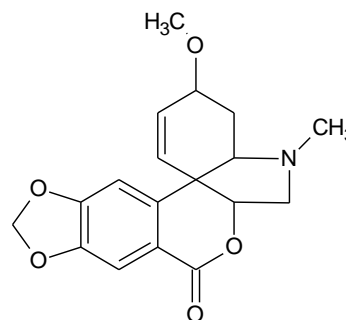
1 Haemanthamin



2 Tazettin



3 Undulatin



4 3-Epimakronin

Obr. 25 Strukturální vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibulí *Sprekelia formossisima*

5.6 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Sternbergia lutea* (L.) Ker Gawl. Ex Spreng a jeho GS/MS analýza

Poslední rostlinou, která byla podrobena GC/MS analýze a biologickým testům byla *S. lutea*. V jejím alkaloidním profilu se podařilo identifikovat pouze dva alkaloidy a to lykorin (95%) a haemanthamin (5%) (Tab. 9). Chromatografický záznam a struktury identifikovaných látek jsou zobrazeny na následujících obrázcích (Obr. 26 a Obr. 27).

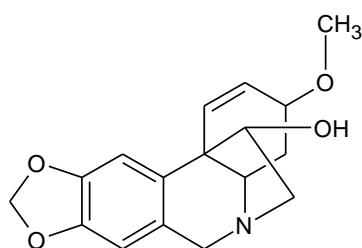
U extraktů a čistých alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidaceae je zatím málo informací o inhibiční aktivitě vůči BuChE, nicméně v porovnání s předchozími studiemi^{83,99}, *S. lutea* vykazuje zatím nejlepší aktivitu vůči HuBuChE (humánní butyrylcholinesterasa) s hodnotami $IC_{50} 3,07 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$. Navzdory tomu, že jsme identifikovali pouze lykorin a haemanthamin, které již byly v naší laboratoři izolovány a jeví se jako neaktivní (nepublikované data), jsme získali velice slibnou inhibiční aktivitu. Otázkou je, zda je tato aktivita způsobena přítomností těchto látek, či se v extraktu vyskytuje látka ve velmi nízké koncentraci, kterou se nám nepodařilo identifikovat.

Inhibiční aktivita vůči HuAChE s hodnotou $IC_{50} 469,8 \pm 5,2 \mu\text{g/ml}$ je pro nás nezajímavá⁸⁴.

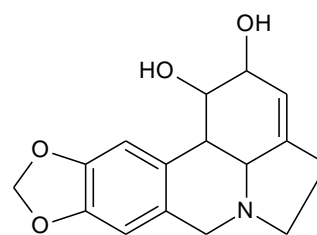
Tab. 9 Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS a popis jejich hmotnostních spekter

| Sloučenina | RT ^a (min) | [M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita) | % | Reference pro MS |
|----------------|--------------------------|--|----|--------------------|
| 1 Haemanthamin | 27,34 | 301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15) | 5 | NIST 08, standardy |
| 2 Lykorin | 29,79 | 287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100) | 95 | NIST 08, standardy |

^a podmínky pro GC/MS analýzu jsou popsány v experimentální části

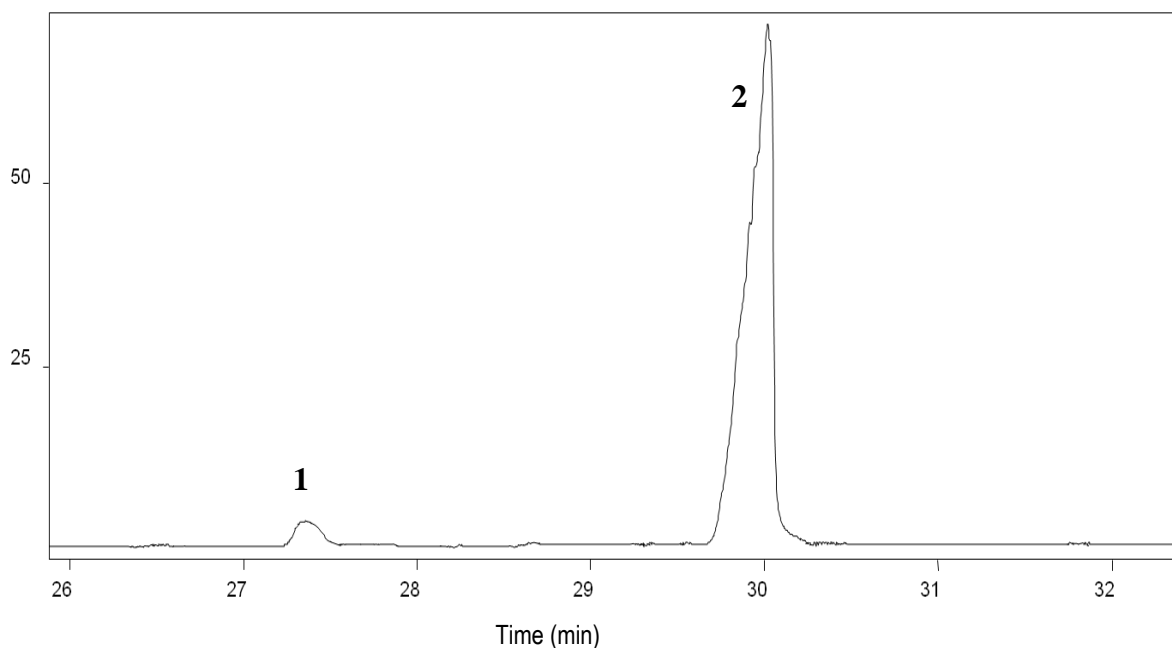


1 Haemanthamin



2 Lykorin

Obr. 26 Strukturální vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibulí *Sternbergia lutea*



Obr. 27 Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Sternbergia lutea*

5.7 Antioxidační aktivita extraktů čeledi Amaryllidaceae

Oxidační stres hraje nezanedbatelnou roli v progresi AD. Z tohoto důvodu byly jednotlivé alkaloidní extrakty podrobeny testům na jejich antioxidační aktivitu za použití DPPH testu. Bohužel ani jeden z extraktů nevykázal žádnou antioxidační aktivitu.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce byla provedena GC/MS analýza a testování na antioxidační (DPPH test) a inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám (HuAChE, HuBuChE) 6 rostlin čeledi Amaryllidaceae.

Během jednotlivých analýz se nám podařilo identifikovat celá řada alkaloidů produkovaných čeledí Amaryllidaceae, které patří do různých strukturních typů. Některé látky zůstaly neurčeny a to hlavně z důvodu nedostupnosti jejich MS spekter v literatuře či v komerčních knihovnách. Další možností je, že tyto látky nebyly doposud izolovány a tudíž ani strukturně popsány. Zde je tedy nutné nejprve látky izolovat v dostatečném množství pro strukturní analýzu.

Všechny alkaloidní extrakty byly podrobeny testům na jejich inhibiční aktivitu vůči HuAChE a HuBuChE. Nejlepší HuAChE inhibiční aktivita byla zaznamenána u alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Nerine undulata* (IC_{50} $14,3 \pm 1,2$ $\mu\text{g/ml}$). V tomto extraktu dominovaly alkaloidy krinanového typu [80% TIC (totální iontový proud)], což je velice zajímavé v porovnání s údaji v literatuře, které označují alkaloidy krinanového typu pouze za slabé inhibitory. Vzhledem ke skutečnosti, že byla doposud izolována a testována poměrně úzká škála alkaloidů těchto struktur, je možné, že i mezi těmito látkami se budou vyskytovat sloučeniny schopné AChE inhibice. Z toho důvodu je potřeba tyto látky izolovat v co nejširší škále a podrobit je testům.

Na základě literárních údajů z posledních let, že v pokročilejších stádiích AD roste význam BuChE, se výzkum v oblasti inhibice cholinesteráz nejnověji zaměřuje na hledání látek schopných inhibovat jak AChE, tak i BuChE. V naší studii byla nejlepší inhibiční aktivita vůči HuBuChE získána u alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Sternbergia lutea* (IC_{50} $3,07 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$). Zajímavostí je, že v alkaloidním profilu byly identifikovány pouze 2 látky, které již byly izolovány v naší laboratoři a jsou neaktivní (nepublikované výsledky). Jak již bylo diskutováno, v rámci výsledků a diskuze, zůstává otázkou, co (kooperace dvou látek?) nebo jaká látka je zodpovědná za tuto inhibici.

Závěrem je potřeba říct, že hlavním úkolem této diplomové práce bylo vytipovat rostlinu nejvhodnější pro fytochemickou studii na základě GC/MS analýzy a biologických testů. Zajímavou rostlinou se jeví *N. undulata* a *N. filamentosa*. Veškeré výsledky této diplomové práce jsou shrnuty a zveřejněny v rámci dvou původních prací v časopise *Natural Product Communication*^{83,84}.

7 Literatura

1. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the “common“ neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68; 326-7
2. den Dunnen WF, Bouwer WH, Bijlard E, et al. No disease in the brain of a 115-year-old woman. *Neurobiol. Aging* 2008; 29; 1127-32
3. Pydychová E: Alzheimerova nemoc, Solutio 2002/2003, Medon, Praha 2002.
4. Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moriera PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65; 631-41
5. Castellani RJ, Zhu X, Lee H, Smith MA, Perry G. Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: Reductionist versus expansionist approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10; 1386-1406
6. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* 2010; 362; 329-44
7. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007; 8; 101-2
8. Kaye R, Head E, Thompson JL, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003; 300; 486-9
9. Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers – a decade of discovery. *J. Neurochem.* 2007; 101; 1172-84
10. Kamenetz F, Tomita T, Hsleh H, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003; 37; 925-37
11. Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci. Lett.* 2003; 350; 113-6
12. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, et al. Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin. *Science* 2001; 292; 1550-2
13. Qui WQ, Walsh DM, Ye Z, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273; 32730-8
14. Leissring MA, Farris W, Chang AY, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 2003; 40; 1087-93
15. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24; 1121-59
16. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1739; 198-210

17. Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, et al. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cell but can be reversed by inhibitor drugs. *J. Biol. Chem.* 2006; *281*; 1205-14
18. Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; *1739*; 240-50
19. Gómez-Isla T, Hollister R, West H, et al. Neuronal loss correlates with but exceed neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1997; *41*; 17-24
20. Wallin AK, Blennow K, Andreasen N, Minthon L. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2006; *21*; 131-8
21. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incident Alzheimer disease in patient with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009; *302*; 385-93
22. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; *39*; 409-21
23. Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM, et al. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr. Med. Chem.* 2006, *13* (9), 1075
24. Zhu X, Smith MA, Honda K, et al. Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neurol. Sci.* 2007; *257* (1-2); 240
25. Siegel SJ, Bieshke J, Powers ET, et al. The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry* 2007; *46* (6); 1503
26. Cai Z, Yan Y. Pathway and mechanism of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Med. Coll. PLA* 2007; *22* (5); 320
27. Smith MA, Perry G, Richey PL, et al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996; *382*; 120-1
28. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, et al. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation of the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; *91*; 3270-4
29. Combs Ck, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. Beta-amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neuronal.* 2001; *21*; 1179-88
30. Loewi O. Überhudrale Übertragbarkeit der Herzenvenwirkung. *Pflugers. Arch.* 1921; *189*; 239-42

31. Ogura H. Pharmacological Overview and Future Perspectives of Cholinergic Therapy in Alzheimer's disease. *Curr. Drug Ther.* 2009; 4; 65-72
32. Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 2006; 23; 181-99
33. Massoulie J, Pezzemneti L, Bon S, Krejci E, Valette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Neurobiol.* 1992; 41; 31-91
34. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1989; 260; 625-34
35. Cokugras AN. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk. J. Biochem.* 2003; 28 (2); 54-61
36. Allderdice PW, Garner HAR, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpines J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site. *Genomics* 1991; 11; 452-4
37. Dave KR, Syal AR, Katyare SS. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z. Naturforsch. C.* 2000; 55; 100-8
38. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982; 215; 1237-9
39. Berkov S, Pavlov A, Georgiev V, Weber J, Bley T, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Changes in apolar metabolites during *in vitro* organogenesis of *Pancreatium maritimum*. *Plant Physiol. Bioch.* 2010; 48 (10-11); 827-35
40. Massoulie J, Sussman J, Bon S, Silman J. Structure and function of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Brain Res.* 1993; 98; 139-46
41. Altramino CV, Lockridge O. Association of tetramers of human butyrylcholinesterase is mediated by conserved aromatic residues of the carboxy terminus. *Chem. Biol. Int.* 1999; 119; 53-60
42. Raveh L, Grauver E, Grunwald J, Cohen E, Ashani Y. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1997; 145; 43-53
43. Jiráček R. Farmakoterapie demencií. *Prakt. Lékař. 2008; 6; 286-8.* Dostupné na: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2008/06/05.pdf>. Staženo dne: 9. 4. 2012
44. Keowkase R, Luo Y. Mechanism of CNS Drugs and their Combinations for Alzheimer's disease. *CNS Agents Med. Chem.* 2008; 8; 241-8

45. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer's type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1978; 4; 273-7
46. St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiat.* 2000; 47; 183-99
47. Reiman EM, Chen K, Liu X, et al. Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106; 6820-5
48. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97; 2892-7
49. Unver N. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochem. Rev.* 2007; 6; 125
50. Nagy M, Grančai D, Mučaji P. *Farmakognózia – Biogenéza porodných látok*. 1. vyd.; Osveta; Martin; 2011; 237 s.
51. Jahodář L. *Farmakobotanika semenné rostliny*. 1. vyd.; Karolinum; Praha; 2006; 258 s.
52. Jin Z. Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2009; 26; 363
53. Chase MV, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 2009; 161; 105
54. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Nerine>. Staženo dne: 11. 4. 2012
55. Nair JJ, Campbell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry* 2005; 66; 373-82
56. van Rijn RM, Rhee IK, Verpoorte R. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine Bowdenii*. *Nat. Prod. Res.* 2010; 24; 222-5
57. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/NerineSpeciesOne#bowdenii>. Staženo dne: 11. 4. 2012
58. Lyle RE, Kielar EA, Crowder JR, Wildman WC. Alkaloids of amaryllidaceae. XV. The alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Wats. and *Crinum moorei* J. D. Hook. *J. Am. Chem. Soc.* 1960; 82; 2620-5.
59. Slabaugh MR, Wildman WC. 6-Hydroxybuphanidrine and 6-Hydroxyypowelline. *J. Org. Chem.* 1971; 36; 3202-7
60. Rhee IK, Appels N, Hofte B, Karabatak B, Erkelens C, Stark LM, Flippin LA, Verpoorte R. Isolation of the Acetylcholinesterase Inhibitor Ungeremin from *Nerine*

- bowdenii* by Preparative HPLC Coupled On-Line to a flow Assay System. Biol. Pharm. Bull. 2004; 27; 1804-9
61. <http://botany.cz/foto/nerineherb1.jpg>. Staženo dne: 11. 4. 2012
62. http://www.shieldsgardens.com/images/Nerine_filifolia_8-m.jpg.
Staženo dne: 12. 4. 2012
63. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/NerineSpeciesThree#undulata>.
Staženo dne: 12. 4. 2012
64. Boit HG. Amaryllidaceous alkaloids. XI. Alkaloids of *Chlidanthus fragrans*, *Valotta purpurea*, *Nerine undulata*, and *Hippeastrum vittatum*. Chem. Berichte 1956; 89; 1129-34
65. Boit HG, Döpke W. Parkamine and nerundine, two new Amaryllis alkaloids. Naturwissenschaften 1959; 46; 228
66. Neuwinger HD. African Ethnobotany – Poisons and Drugs. Chapman and Hall 1996; 1. vydání; 941 s.
67. http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/files/Nerine/Nerine_undulata_CM2.jpg.
Staženo dne: 12. 4. 2012
68. <http://www.plantzafrica.com/plantqrs/plimagesqrs/sscadflower2.jpg>.
Staženo dne: 12. 4. 2012
69. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Sprekelia>.
Staženo dne: 12. 4. 2012
70. <http://botany.cz/cs/sprekelia-formosissima/>. Staženo dne: 13. 4. 2012
71. Roca J. Chemical Study of *Sprekelia formosissima*. Anales inst. biol. 1932; 3; 25-8
72. Wildman WC, Brown CL, Michel KH, Bailey DT, Heimer NE, Shaffer R, Murphy CF. Alkaloids from *Rhodophiala bifida*, *Crinum erubescens* and *Sprekelia formosissima*. Pharmazie 1967; 22; 725
73. Hohman J, Forgo P, Molnar J, Wolfard K, Molnar A, Thalhammer T, Mathe I, Sharples D. Antiproliferative Amaryllidaceae Alkaloids Isolated from the Bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis festalis*. Planta Med. 2002; 68; 454-7
74. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Sprekelia_formosissima_1.jpg.
Staženo dne: 13. 4. 2012
75. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Sternbergia>.
Staženo dne: 13. 4. 2012
76. <http://www.garten.cz/a/cz/2272-sternbergia-luzanka/>. Staženo dne: 14. 4. 2012

77. Citoglu GS, Acikara OB, Yilmaz BS, Ozbek H. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia* 2012; 83; 81-7
78. Mammadov R, Kara Y, Vaizogullar HE. Study of phenolic content, antioxidant and antimicrobial effects of *Sternbergia clusiana*. *Asian J. Chem.* 2011; 23; 5280-4
79. Tanker M, Citoglu G, Gumusel B, Sener B. Alkaloids of *Sternbergia clusiana* and their analgesic effect. *Int. J. Pharmacognosy* 1996; 34; 194-7
80. Evidente A. Identification of 11-hydroxyvittatine in *Sternbergia lutea*. *J. Nat. Prod.* 1986; 41; 168-9
81. Evidente A. Isolation and structural characterization of lutesine, a new alkaloid from bulbs of *Sternbergia lutea*. *J. Nat. Prod.* 1986; 49; 90-4
82. http://www.botanicalgarden.ubc.ca/potd/sternbergia_lutea1.jpg.
Staženo dne: 14. 4. 2012
83. Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Urbanová K, Opletal L. GC/MS Analysis of Three Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity. *Nat. Prod. Comm.* 2011; 6; 1255-8
84. Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Kučera R, Hrstka V, Klimeš J, Jahodář L, Opletal L. Alkaloids from Some Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity. *Nat. Prod. Comm.*; v tisku
85. Steck TL, Kant JA: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Method. Enzymol.* 1974; 31; 172.
86. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7; 88
87. http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD_1%C3%A1tky/Chemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/Alkaloidy. Staženo dne: 14. 4. 2012
88. Krejčová G, Ševelová L. Současné poznatky o galanthaminu, reversibilnímu inhibitoru acetylcholinesterasy. *Voj. Zdrav. listy* 2003; 72; 37-44
89. Hong AW, Cheng TH, Raghukumar V, Sha ChK. An Expedient Route to Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloids: Total Syntheses of (–)-Brunsvigine and (–)-Manthine. *J. Org. Chem.* 2008; 73; 7580-5
90. Luchetti G, Johnston R, Mathieu V, Lefranc F, Hayden K, Andolfi A, Lamoral-Theys D, Reisenauer MR, Champion C, Pelly SC, van Otterlo WAL, Magedov IV, Kiss R,

- Evidente A, Rogelj S, Kornienko A. Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. *ChemMedChem*; v tisku
91. McNulty J, Nair JJ, Little JRL, Brennan JD, Bastida J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids; *Biochem. Med. Chem. Lett.* 2010; 20; 5290-4
 92. Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochem. Syst. Ecol.* 2008; 36; 638-45
 93. Labrana J, Choy G, Solans X, Font-Bardia M, de La Fuente G, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Narcissus alkaloids. Part 25. Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* 1998; 50; 183-8
 94. Kreh M, Matusch R. *O*-Methylodulatine and *N*-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry* 1995, 38, 1533-5
 95. López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of same Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* 2002; 71; 2521-9
 96. Houghton P, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 2006; 23;181-9
 97. Berkov S, Pavlov A, Ilieva M, Burrus M, Popov S, Stanilova M. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their in vitro cultures. *Phytochem. Analysis* 2005; 16; 98-103
 98. Boit HG, Dopke W. New alkaloids from *Nerine flexulosa* and *Nerine bowdenii*. *Naturwissenschaften* 1960; 47; 109
 99. Cahlíková L, Macáková K, Zavadil S, Jiroš P, Opletal L, Urbanová K, Jahodář L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Comm.* 2011; 6; 603-6
 100. Cahlíková L, Zavadil S, Macáková K, Valterová I, Kulhánková A, Hošťálková A, Kuneš J, Opletal L. Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Comm.* 2011; 6; 1827-30
 101. Elgorashi EE, Stafford GI, van Staden J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 2004; 70; 258-60

8 Seznam zkratek

| | |
|---------|--|
| AD | Alzheimerova choroba |
| ACh | acetylcholin |
| AChE | acetylcholinesteráza |
| APP | amyloidní prekurzorový protein |
| BuChE | butyrylcholinesteráza |
| CNS | centrální nervová soustava |
| DPPH | 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl |
| DTNB | kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová |
| EC | účinná koncentrace |
| GC | plynová chromatografie |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| HuAChE | humánní acetylcholinesteráza |
| HuBuChE | humánní butyrylcholinesteráza |
| IC | inhibiční koncentrace |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NIST 08 | knihovna hmotnostních referenčních spekter |
| NMDA | N-methyl-D-aspartát |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| NSAID | nesteroidní antiflogistika |
| TIC | totální iontový proud |