UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin I.

Alkaloidy *Narcissus jonquilla* L.

Biological activity of secondary plants metabolites I.

Alkaloids of *Narcissus jonquilla* L.

Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Ločárek

Hradec Králové, 2015 Dana Nováková

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 řádně citovány.

V Hradci Králové 2015

.....

Podpis

Chtěla bych moc poděkovat Ing. Miroslavu Ločárkovi za poskytnuté materiály, vstřícný přístup a odborné rady při zpracování této diplomové práce, PharmDr. Tomášovi Siatkovi, CSc. za změření biologických aktivit alkaloidních extraktů. Dále děkuji celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu pomoci při řešení nejrůznějších problémů.

OBSAH

1 ÚVOD ... 6
2 CÍL PRÁCE ... 9
3 TEORETICKÁ ČÁST ... 11
3.1 Alzheimerova choroba ... 12
3.1.1 Klinický obraz ... 12
3.1.2 Etiologie onemocnění ... 12
3.1.3 Enzymy ovlivňující patogenezi choroby ... 17
3.1.4 Farmakologická léčba AD ... 18
3.2 Čeleď Amaryllidaceae ... 23
3.2.1 Charakteristika alkaloidů čeledi Amaryllidaceae ... 23
3.2.2 Klasifikace alkaloidů čeledi Amaryllidaceae ... 23
3.2.3 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae ... 26
3.2.4 Rod *Narcissus* ... 28
3.3 Biologické aktivity alkaloidů rodu *Narcissus* ... 32
3.3.1 Galanthaminový typ ... 32
3.3.2 Homolykorinový typ ... 32
3.3.3 Krininový typ ... 33
3.3.4 Lykorinový typ ... 34
3.3.5 Pankratistatinový typ ... 34
3.3.6 Tazettinový typ ... 35
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 36
4.1 Všeobecné postupy ... 37
4.1.1 Destilace ... 37
4.1.2 Odpařování ... 37
4.2 Materiál a vybavení pro přípravu extraktů ... 37
4.2.1 Rozpouštědla ... 37
4.2.2 Chemikálie ... 37
4.3 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza ... 38
4.3.1 Biologický materiál ... 38
4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu ... 38
4.3.3 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů ... 39

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuchE ... 39

4.4.1 Materiál a vybavení pro přípravu cholinesterasové aktivity (včetně přípravy erythrocytárních pouzder) ... 39

4.4.2 Podmínky měření ... 40

4.4.3 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC_{50}) ... 41

5 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 42

5.1 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial a jeho GC/MS analýza ... 44

5.2 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc a jeho GC/MS analýza ... 46

5.3 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness a jeho GC/MS analýza ... 48

5.4 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry a jeho GC/MS analýza ... 50

5.5 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex a jeho GC/MS analýza ... 52

5.6 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Twinkling Yellow a jeho GC/MS analýza ... 54

5.7 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Yazz a jeho GC/MS analýza ... 56

6 ZÁVĚR ... 58

7 SEZNAM ZKRATEK ... 60

8 LITERATURA ... 62

1 ÚVOD

Přírodní zdroje se používají k získání léčivých látek již celá staletí. Jejich význam přetrvává od počátků tradičního lidového léčitelství až do současné moderní medicíny. Mezi jedny z takto běžně užívaných zdrojů patří i rostliny z čeledi Amaryllidaceae, které byly prvotně k léčeným účelům používány především v oblastech jejich původního výskytu, tedy v Jižní Africe a Jižní Americe, ale i v jižní a střední Evropě. První dokumentované lékařské využití rostlin z čeledi Amaryllidaceae pochází ze 4. století před naším letopočtem, kdy Hippokrates léčil pomocí extraktu z narcisu *Narcissus poeticus* děložní tumory.[1] V České republice můžeme v současnosti jako volně rostoucí zástupce čeledi Amaryllidaceae nalézt rody narcis (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) a sněženka (*Galanthus*).

Důležitou složkou zapříčiňující biologické působení u této čeledi jsou alkaloidy. Alkaloidy jsou dusíkaté, zpravidla heterocyklické organické látky zásadité povahy, které vznikají při metabolismu aminokyselin u celé řady rostlin. V současnosti je známo asi 3000 alkaloidů u 4 000 rostlinných druhů. Vyskytují se buď volně, nebo mnohem častěji vázané na nějakou organickou kyselinu ve formě solí snadno rozpustných ve vodě. Zpravidla v rostlině není jen jediný alkaloid, ale celá skupina příbuzných sloučenin, které mohou být v různých částech rostliny zastoupeny nerovnoměrně. Jsou to obvykle pevné krystalické látky, bezbarvé, bez zápachu, často silně hořké chuti. Opticky jsou aktivní, většinou levotočivé.[2]

Alkaloidní extrakty rostlin čeledi Amaryllidaceae jsou předmětem aktivního chemického zkoumání posledních téměř 200 let. Během posledních tří dekád byly mnohé z nich izolovány, testovány na biologickou aktivitu i syntetizovány různými výzkumnými skupinami. Účinky těchto látek jsou rozmanité, vykazují mimo jiné aktivitu k fyziologicky významným enzymům, antibakteriální, antivirotickou, cytotoxickou a to nejen k buňkám zdravým, ale především nádorově transformovaným.[3]

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění spojené se stářím. Jde o mnohostrannou poruchu charakterizovanou akumulací β-amyloidových plaků, intracelulární patologií τ-proteinů. Toto progredující onemocnění se projevuje mitochondriálními abnormalitami a neurozánětlivými procesy. Dochází k pomalé destrukci neuronů a snižuje se schopnost zapamatovat si a přijímat nové informace.[4]

Klíčovou roli v patologii AD má acetylcholin. Acetylcholin je neurotransmiter inhibovaný acetylcholinesterázou a butyrylcholinesterázou. Butyrylcholinesteráza se nachází

v podstatně vyšším množství v placích u nemocných AD ve srovnání s plaky vzniklými běžným stárnutím v mozku lidí, kteří netrpí tímto onemocněním.[5]

Mezi inhibitory cholinesteráz řadíme galanthamin, látku i v současné době používanou k léčbě AD. Galanthamin je selektivní a reverzibilní inhibitor enzymu acetylcholinesterázy. V posledních letech se ukazuje i nezanedbatelný význam butyrylcholinesterázy v patofyziologii AD, proto ve výzkumu biologických inhibičních aktivit mají svůj význam oba tyto enzymy: acetylcholinesteráza i butyrylcholinesteráza.

2 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

1. Příprava alkaloidních extraktů vybraných zástupců rodu *Narcissus*.

2. Příprava vzorků pro biologické testování

3. GC/MS analýza alkaloidních extraktů.

4. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidního extraktu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.

Jedná se o pokračování výzkumu katedry farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Práce vychází z činnosti pracovní skupiny ADINACO, která se zabývá izolací obsahových látek vybraných alkaloidních rostlin a sledováním jejich biologické aktivity.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Ve věkové skupině starších 60 let se celosvětový výskyt demence pohybuje mezi 5 až 7 %. Odhaduje se, že v roce 2010 žilo celkově v populaci 35,6 milionů lidí s demencí.[6]

Onemocnění představuje 50 % všech demencí. Do 45 let věku je to onemocnění vzácné. Mezi šedesátiletými onemocnění postihuje 5 % populace, každých pět let se s věkem počet nemocných zdvojnásobuje.[7]

Variabilita klinického průběhu i histopatologických nálezů naznačuje, že AD je heterogenní klinicko-patologická entita, jejíž mechanismy nemusí být zcela homogenní. Původní dělení na presenilní a senilní onemocnění však nemá klinický význam a není podloženo žádnými konzistentními rozdíly v patologii.[8]

3.1.1 Klinický obraz

Mezi hlavní příznaky AD řadíme postupně se rozvíjející a dále progredientní poruchy paměti (vštípivosti i výbavnosti) a dalších kognitivních funkcí (poruchy řeči, porozumění, apraxie, akalkulie, poruchy prostorové orientace). Častým příznakem jsou výkyvy nálad a poruchy chování (deprese, apatie střídaná s podrážděností, agresivitou). Nejdříve se mohou střídat „dobré a špatné dny“, později nemocní přestávají poznávat své okolí, ztrácejí se i ve známém prostředí, nezvládají i jednoduché úkony běžné denní činnosti. Již zpočátku pozorujeme ztrátu náhledu na vlastní onemocnění a projevy chorobné obrazotvornosti. Mezi typické změny osobnosti u AD řadíme sklon k pasivitě a ztrátu zájmu o dříve oblíbené činnosti. S tím souvisí narušení sociálního chování i citových vazeb. Mohou se vyskytnout psychotické projevy (halucinace, bludy), spánková inverze, poruchy příjmu potravy. Neporušena zůstává pacientova hybnost. Terminálně dochází k úplné dezorientaci pro poruchu paměti, průměrná doba přežití je kolem 10 let.[9]

3.1.2 Etiologie onemocnění

3.1.2.1 β-amyloid a formace plaků

Mezi nejvýznamnější mechanismy vzniku AD řadíme tvorbu a ukládání patologického proteinu β-amyloidu, který tvoří základ tzv. alzheimerovských plaků. V neuronech je běžně přítomna bílkovina amyloidový prekurzorový protein, který je za zdrojem β-amyloidu. APP je za fyziologických podmínek štěpen enzymem α-sekretázou na solubilní fragmenty o délce do

39-40 aminokyselin. Vzniklé fragmenty působí neuroprotektivně a účastní se paměťových mechanismů. Za patologických podmínek se ve zvýšené míře uplatňují při štěpení amyloidového prekurzorového proteinu i enzymy β- a γ-sekretáza. které následně štěpí amyloidový prekurzorový protein na jiných místech než α-sekretázy. Vytvářejí se nesolubilní fragmenty o délce 42 nebo 43 aminokyselin. Nejprve vznikají neurotoxické polymery. Poté dochází k jejich další koagulaci a polymeraci v extracelulárních prostorách a vzniku alzheimerových plaků. V okolí plaků dochází k zániku synapsí a neuronů, k degenerativním projevům, k aktivaci gliových elementů a ke sterilní zánětlivé reakci zahrnující aktivaci cyklooxygenázy II, dále k uvolnění řady látek, jako jsou volné kyslíkové radikály, excitační aminokyseliny, cytokiny a další, které jsou v nadbytku škodlivé a působí další neurodegenerativní změny.[8,10] O těchto mechanismech je pojednáno dále.

3.1.2.2 τ-protein a tvorba tangles

V neuronech dochází v souvislosti s AD ještě k další patologické přeměně proteinu. τ-protein je za fyziologických podmínek defosforylovaný a stabilizuje neuronální tubuly. Proteinkinázami hyperfosforylovaná forma τ-proteinu se polymerizuje a dochází k jeho degeneraci a vzniku párových helikálních filament, z kterých vznikají tzv. tangles neboli neuronální uzlíčky. Postižené neurony pak zanikají. Významné místo mezi proteinkinázami zaujímá glykogensyntázakináza-3β. Tento enzym může být aktivován β-amyloidem.[10]

3.1.2.3 Oxidační stres a volné radikály

Oxidační stres se široce podílí na patogenezi AD. Hypotéza o vztahu mezi oxidačním stresem a AD byla odvozena od hypotézy volných radikálů spojených se stárnutím a hovoří o tom, že s věkem související akumulace kyslíkových radikálů může být odpovědná za poškození většiny buněčných součástí.[11]

Přestože je stále otázkou, jako je tomu i u jiných patogenetických procesů, zda jsou v případě AD volné radikály příčinou nebo následkem poškození tkání, součástí patogenetického řetězu nemoci být rozhodně mohou.[12]

Oxidační stres je objektivně měřitelný jako oxidační produkty proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Mnoho ze studií bylo provedeno u pozdního stádia nemoci, nicméně jiné práce ukazují, že hodnoty isoprostanů (biochemický marker oxidace lipidů) jsou zvýšeny

i v počátečních stádiích AD. Vznik kyslíkových radikálů není ještě zcela objasněn, nicméně je známo, že β-amyloidy jsou schopny vázat ionty mědi (Cu^{II}) a redukovat je (Cu^{I}) a uvolňovat při tom peroxid vodíku. Obdobně mohou reagovat i jiné kovy (např. hliník a železo). Navíc se uvádí, že se při ruptuře mitochondriální membrány mohou uvolňovat chemicky volné kyslíkové radikály a podílet se na dalším poškození.

Je neustále předmětem diskuse jakým způsobem β-amyloid zapříčiní v souvislosti s oxidačním stresem neuronální dysfunkci a smrt. Pozornost je v současné době zaměřena na malé, rozpustné agregáty β-amyloidu jako patogenního agens. Poslední výzkumy naznačují, že proces agregace může být toxický, možná generováním kyslíkových radikálů. Lepší porozumění významu intracelulárního β-amyloidu nám může poskytnout nové možnosti v léčbě AD.[13]

Následkem peroxidace lipidů buněčných membrán neuronů volnými kyslíkovými radikály takto postižené neurony zanikají. Při zániku neuronů dochází k nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát), které se váží na své receptory v centrální nervové soustavě. Při hyperexcitaci receptorů typu NMDA, spojených s kalciovými kanály, dojde k výraznému influxu vápníkových iontů do neuronů. Tento mechanismus způsobí destabilizaci vnitřního prostředí neuronů, a aktivuje proteinkinázy. Celý proces je zakončen neuronovou smrtí. Znovu se uvolňují excitační aminokyseliny a vzniká kaskádová reakce. Navíc v kortexu lidí postižených AD je porušeno zpětné vychytávání glutamátu, čímž se dále zvyšuje excitotoxicita.

Druhým předpokládaným mechanismem spojeným s excitací receptorů s následným negativním působením na paměť a další kognitivní funkce probíhá na NMDA receptorech, kde fyziologicky dochází k jednomu ze základních mechanismů učení, k tzv. dlouhodobé potenciaci. Opakuje-li se stejný podnět, zvyšuje se následný excitační postsynaptický potenciál. Správná funkce glutamátergních receptorů je tedy pro paměť a učení nezbytná. Hyperexcitace NMDA receptorů však způsobí, že vznikají jakési přenosové šumy, a podněty, které mají na receptor působit, se nepřenášejí dostatečně.[10]

3.1.2.4 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je látka tělu vlastní, která má své fyziologické funkce, např. transport cholesterolu. ApoE, tvořený gliovými elementy, tvoří komplexy s cholesterolem

a fosfolipidy, které pak transportuje do neuronů pomocí vazebných míst pro LDL. Jedná se o protein, který je součástí několika plazmatických lipoproteinů. Gen pro ApoE je polymorfní, vyskytuje se ve třech alelách na chromozomu 19. U lidí jsou známy různé izoformy apolipoproteinu: E2, E3 a E4. Lidé vybavení izoformou E4, zejména homozygotní alelickou kombinací E4/E4, inklinují ke vzniku AD 3-5krát častěji než srovnatelná populace s jinými izoformami ApoE. Lidé, kteří jsou homozygoti v alelách ApoE4 jsou ohroženi podstatně větším rizikem vývoje pozdní formy AD než lidé, kteří jsou heterozygoti, nebo nositeli alely ApoE4 nejsou. Nosičství alely ApoE4 je význačným rizikovým faktorem vzniku onemocnění. Lidé, kteří jsou nosiči dvou alel ApoE4 onemocní mladší než ti, kdo jsou nosiči jen jedné, nebo žádné alely ApoE4. Mezi lidmi, kteří jsou nositelé jedné alely ApoE4 a lidmi, kteří jejími nositeli nejsou, nebyl zjištěn co do věku, v němž se projevuje onemocnění, rozdíl.[10, 12]

3.1.2.5 Zánět

V oblasti plaků vzniká sterilní zánět a následně se aktivují různé typy buněk. V rámci akutní reakční fáze dochází i k aktivaci cyklooxygenázy 2, k uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů a k expresi histokompatibilních komplexních antigenů. Tyto skupiny pak působí další neurodegenerativní změny.[10]

Peptidy spouští zánět a stimulují COX-2 aktivitu v neuronech, gliích (mikrogliích a astrocytech) a cerebrovaskulárních buňkách. Cyklooxygenáza 2 je jedním z hlavních enzymů zapojených do zánětu a má klíčovou úlohu v syntéze prostaglandinů.[13]

Aktivovaná mikroglie v senilních placích se tvarově odlišuje od klidové (resting) mikroglie. Důkazem imunitní aktivity glie je vysoká míra exprese histokompatibilních antigenů II. třídy (HLA-DR) v blízkosti amyloidových depozit. V mikroglii se při AD rovněž prokazuje vysoký počet receptorů I. třídy MHC (major histocompatibility complex), C3 a C1q složek komplementu, interleukinu-1 a feritinu. Imunitně aktivované mononukleární fagocyty mohou vylučovat potenciálně neurotoxické cytokiny.[12]

Několik epidemiologických studií ukázalo, že použití neselektivních COX inhibitorů je spojeno se snížením rozvoje AD. COX-2 inhibitory vykazují vlastnost změnit patologii nemoci a zlepšit některé složky chování u transgenních myších modelů s AD. Nicméně u těchto myších modelů se prokázalo, že COX-2 inhibitory mohou ovlivnit APP proces. Další studie

jsou potřebné k určení, zda COX-2 inhibitory budou mít pozitivní nebo negativní přínos v léčbě AD.[13]

3.1.2.6 Genetické předpoklady

Různé formy AD jsou podmíněny genovými poruchami na chromozomu 21(gen pro amyloidový prekurzorový protein), chromozomu 14 a chromozomu 1 (geny pro presenilin 1 a 2). Nemoc má souvislost s genem pro apolipoprotein E na chromozomu 19, jak již bylo uvedeno u apolipoproteinu E. Dále onemocnění zřejmě souvisí i s mutacemi mitochondriální DNA. Byla zjištěna i pravděpodobná souvislost locusu na chromozomu 12. Rizikové faktory tvoří toxické látky, trauma a pomalé viry.[12, 7]

3.1.2.7 Atrofie mozku

U AD zjišťujeme mozkovou atrofii, tj. úbytek mozkové tkáně, který se může projevit tím, že je mozková kůra ztenčená a dochází k rozšíření dutého systému mozku (mozkové komory). Zánik mozkových buněk probíhá selektivně, postihuje nervové buňky tzv. cholinergního systému - tento systém je velmi důležitý mj. pro mechanismy paměti. Nejvýrazněji se změny projevují u mediální temporální struktury.[7]

3.1.2.8 Reparační procesy

U nemocných AD pozorujeme nedostatek tzv. nervových růstových faktorů, mozkových hormonů, které ovlivňují mozkové reparační procesy.[14]

Poškození neuronů v *nucleus basalis* se předpokládá jako důsledek primární kortikální patologie, která má za výsledek snížení těch růstových faktorů, které jsou nutné pro přežití cholinergních neuronů.[10]

3.1.2.9 Amyloidová angiopatie

Asi v 90 % případů AD se prokazuje mozková amyloidová angiopatie, kdy se amyloid ukládá ve stěnách mozkových cév. Není pro tuto nemoc specifická, najde se i v průběhu klinicky normálního stárnutí, Downova syndromu a u řady dalších chorob, často bez závislosti na výskytu plak a klubek.[12]

3.1.3 Enzymy ovlivňující patogenezi choroby

3.1.3.1 Cholinacetyltransferáza

Acetylcholin vzniká v nervových zakončeních reakcí cholinu a acetylkoenzymu A za katalýzy enzymem cholinacetyltransferáza. Acetylcholin je specifický a nízkoafinní neurotransmiter, část molekul acetylcholinu je ukládána do synaptických váčků a část zůstává volná v cytoplazmě. Pokud se acetylcholin uvolní do synaptické štěrbiny, hydrolyzuje jej enzym acetylcholinesteráza na acetyl a cholin. Obdobný děj probíhá také v presynaptických a mimosynaptických oblastech neuronů i glií, kde dochází ke štěpení látek obsahujících cholin. Velká část cholinu se vrací přes vysokoafinní přenosový systém zpět do synaptické štěrbiny, kde je použit při syntéze nového acetylcholinu.[10]

Z hlediska patofyziologie projevů AD je uznávána cholinergní hypotéza. Říká, že hlavním podkladem kognitivní poruchy je ztráta cholinergních neuronů, které jsou úzce propojeny s intelektuálními funkcemi jako je paměť a poznávání, v určitých oblastech mozkové kůry a podkoří a následné snížení hladin acetylcholinu.[15]

3.1.3.2 Esterázy

Klíčovými enzymy u AD jsou cholinesterázy – enzymy rozkládající estery cholinu. Specifickou cholinesterázou je acetylcholinesteráza, která štěpí pouze acetylcholin. Kromě ní existují další cholinesterázy tzv. nespecifické (nepravé), které mohou štěpit i další estery cholinu.[16]

Butyrylcholinesteráza (pseudocholinesteráza) štěpí jak acetylcholin, tak i další estery, např. sukcinylcholin, její fyziologická funkce stále ještě není plně objasněna. Vyskytuje se již ve vyvíjejících se tkáních embryí, kde BuChE může dočasně nahradit AChE a plnit její funkci. U dospělých jedinců se vyskytuje prakticky v celém těle, především v periferní nervové soustavě, svalech, mozku, játrech, srdci a tělních tekutinách.[17]

V nervové tkáni je výskyt AChE asociován s cholinergním systémem, ale je nejasná jeho role tam, kde není žádný acetylcholin. BuChE se vyskytuje v oblastech mozku nesouvisejících s AChE, konkrétně v endoteliálních buňkách, gliích a neuronech.[18]

Obě AChE i BuChE existují jako ve vodě rozpustné formy uvolňované do tělních tekutin.[17] Konkrétně lidská plazma dospělého člověka dle měření pomocí imunosorbentu obsahuje průměrně 8 ng/ml AChE a 3 300 ng/ml BuChE.[19]

3.1.4 Farmakologická léčba AD

Farmakologickou léčbu AD lze rozdělit na dvě základní skupiny: léčiva ovlivňující NMDA receptory a inhibitory cholinesteráz. Jedná se o léčiva s prokázaným účinkem.[20]

Kauzální léčiva nejsou k dispozici, jedná se pouze o symptomatickou léčbu.

S postupem choroby se vyvíjí příznaky jako poruchy chování, emoční labilita a agitace a dochází k nutnosti podání antipsychotické či antidepresivní léčby. Volíme preparáty s minimem anticholinergních účinků, aby se neprohluboval základní chorobný deficit acetylcholinu.

Mimo dvě základní skupiny léčiv používaných jako evidence-based, byly pacientům podávány i další látky, ale bez uspokojivch výsledků. Podávání prekurzorů tvorby acetylcholinu (např. lecitinu) není všeobecně rozšířeno pro vysoké dávkování a velmi slabý efekt.[21] Standardizovaný extrakt z Ginkgo biloba EGb 761 vykazuje pozitivní efekt u pacientů s AD. Chrání buňky před toxickými fragmenty β-amyloidu.[22]

3.1.4.1 Léčiva ovlivňující NMDA receptor

Z této skupiny je v současné době v ČR registrována jediná účinná látka: alkaloid memantin. Jedná se o antagonistu NMDA receptorů, které především tlumí influx vápenatých iontů do neuronů a tím ovlivňují odumírání neuronů. Jeho účinnost a efekt je srovnatelný s inhibitory cholinesteráz.[21]

Částečná blokáda NMDA receptorů vykazuje ještě další mechanismus účinku: snižuje (hypoteticky) přenosové šumy, a tím zlepšuje mechanismus dlouhodobé potenciace – jeden ze základních mechanismů učení. Memantin navíc částečně inhibuje enzym GSK-3β, a zamezí takto degradaci τ-proteinu. Užívání této látky je založeno na důkazech a je indikována u středních až těžších (nikoli terminálních) případů AD.[10]

Memantin je obecně výborně tolerován. Nežádoucí účinky jsou vzácně bolesti hlavy, závratě, únava, obstipace, výjimečně halucinace. Opatrnost je doporučována u pacientů s epilepsií.[20]

3.1.4.2 Inhibitory cholinesteráz

Tíže projevů onemocnění skutečně koreluje s poklesem množství cholinacetyltransferázy, enzymu tvořícího acetylcholin, a se snížením hustoty nikotinových receptorů v mozcích pacientů. Při podání anticholinergních látek zdravým dobrovolníkům klesají kognitivní funkce (a specificky paměť) a při cholinergní stimulaci se projeví jejich zlepšení.[8]

Cholinesterázové inhibitory inhibují enzym AChE, který za normálních podmínek udržuje hladinu ACh v mozku. Funkční buňky produkující AChE mohou obnovit cholinergní deficit v místech synapsí.

Zablokováním AChE se zvýší nabídka acetylcholinu k vazbě na muskarinové i nikotinové receptory. U AD se navíc odbourávání acetylcholinu účastní butyrylcholinesteráza, jejíž molekuly jsou patologicky tvořeny aktivovanými gliovými elementy v oblasti plaků. I na tento enzym inhibitory působí.

Použití AChEI může být tedy nejvhodnější paliativní léčbou, předtím než dojde k závažné degeneraci neuronů a představují léčiva volby u lehkých až středně těžkých forem AD. Všeobecným efektem je zlepšení cholinergní transmise v CNS se zlepšením příznaků a zpomalení nervové progrese onemocnění při dlouhotrvající léčbě druhou a třetí generací AChEI.[15, 21]

Mezi první použité látky z této skupiny byl do praxe zaveden fysostigmin. Nyní jsou používány perorální inhibitory acetylcholinesteráz s dlouhým biologickým poločasem a dobrou tolerancí.[10]

IChE jsou všeobecně dobře tolerovány. Častějšími nežádoucími účinky jsou gastrointestinální potíže (nechutenství, nevolnost až zvracení, průjem). Méně často se vyskytuje nespavost, bolesti hlavy, křeče nebo močová inkontinence. Nežádoucí účinky se objevují především na počátku léčby a při zvyšování dávky.[20]

Hlavními kontraindikacemi podávání inhibitorů cholinesteráz jsou gastroduodenální vředová choroba a těžší poruchy srdečního rytmu (arytmie).[21]

Nové lékové formy IChE

Alternativou k perorální formě IChE při jejich intoleranci je rivastigmin ve formě transdermální náplasti vykazující výrazně lepší snášenlivost než jeho tabletová forma. Aplikuje se na záda, horní část paže i hrudi. Úvodní dávka (4,6 mg/den) se zvyšuje po 4 až 8 týdnech na 9,5 mg/den. Náplasti se mění jednou denně.

Na trhu jsou i rozpustné tablety donepezilu, které nabízí vhodnou alternativu pro pacienty s poruchou polykání.[20]

Účinné látky s registrovanými přípravky v ČR:

Rivastigmin

Jedné se o karbamátový derivát, u kterého bylo prokázáno výrazné zpomalení progrese AD a pozitivní vliv na kognici. Mezi jeho nejčastější nežádoucí účinky patří potíže s gastrointestinálním traktem. Z hlediska lékových interakcí není vhodné ho kombinovat se stejně působícími léčivy, což platí obecně pro celou skupinu inhibitorů cholinesteráz.[9, 20]

Donepezil

Tuto látku řadíme mezi piperidinové deriváty a účinek spočívá ve zlepšení neurotransmise. Donepezil je většinou velmi dobře tolerován. I přes dlouhý vylučovací poločas má minimum lékových interakcí. *In vivo* studie prokázaly, že do metabolismu donepezilu jsou zapojeny izoenzymy 3A4 a méně i 2D6 cytochromu P-450. Proto se nedoporučuje kombinace s antimykotikem ketokonazolem, erythromycinovými antibiotiky a fluoxetinem (kombinace vede k inhibici metabolismu a zvýšení hladiny donepezilu). Kombinace s jinými SSRI jsou bezpečné.[9, 20]

Galanthamin

Z chemického hlediska se jedná o alkaloid s prokázaným výrazným zpomalením progrese AD a pozitivním vlivem na kognici.[9, 20] Galanthamin je selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor enzymu acetylcholinesterázy.[23]

Poprvé byl komerčně využit k léčbě poliomyelitidy ve východní Evropě v 50. letech 20. století. Schopnost galanthaminu proniknout krevní bariérou v mozku a zlepšit centrální cholinergní transmisi vede k využití v paliativní léčbě AD, během které klesají hladiny mozkových neurotransmiterů.[24]

V léčivých přípravcích se galanthamin používá ve formě hydrobromidu. V ČR je v současné době registrován a obchodován jako přípravek Galantamin Mylan s obsahem účinné látky 8, 16 a 24 mg.[25]

Výhoda galanthaminu proti ostatním inhibitorům AChE používaným v terapii Alzheimerovy choroby spočívá v jeho schopnosti alostericky modulovat nikotinové receptory, což zvyšuje produkci ACh.[26] Příznivé účinky galanthaminu pokračují i po ukončení léčby.[23]

Galanthamin je terciární alkaloid rezistentní vůči hydrolýze. Pro biologický účinek galanthaminu jsou klíčové následující 4 části molekuly: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina. Místy účinku galanthaminu jsou nervosvalové spoje, centrální cholinergní synapse i periferní orgány inervované parasympatickými vegetativními vlákny.[27]

Na cholinergní synapsi má galanthamin dvojí roli:

a) inhibicí AChE zvýší hladinu acetylcholinu dostupného pro aktivitu postsynaptických muskarinových receptorů,

b) jako modulátor na nikotinových receptorech, protože v jeho přítomnosti dojde ke zvýšení vazebné afinity ACh na acetylcholinový nikotinový receptor nebo i zvýšené propustnosti kanálů odpovídající obsazeným receptorům. Modulací nikotinových receptorů je tak podporován proces uvolňování ACh cestou nikotinového mechanismu, zvlášť za podmínek poškozené cholinergní funkce.

Tyto procesy mohou také probíhat současně.[28]

Galanthamin je selektivní inhibitor erytrocytární AChE vzhledem k inhibici plazmatické butyrylcholinesterázy (EC_{50} pro BuChE 19,1 µmol/l, pro AChE 0,36 µmol/l). Tato

selektivita galanthaminu k AChE přináší pozitivní efekt ve snížení rizika nežádoucích účinků ve srovnání s neselektivními inhibitory cholinesteráz (typu fysostigminu nebo takrinu).[29]

U kompetitivního inhibitoru nezávisí stupeň inhibice ani tak na absolutní koncentraci inhibitoru, jako spíše na poměru koncentrace inhibitoru a substrátu. Nejúčinnější je inhibitor při nízké koncentraci substrátu, jaká je na postsynaptické membráně ve srovnání s mnohem vyšší koncentrací ACh na presynaptické membráně, pokud je ACh uvolňován do štěrbiny ze zásobních vezikul.[30]

3.2 Čeleď Amaryllidaceae

Rostliny této čeledi jsou vytrvalé byliny s oddenky, hlízami nebo cibulemi. Listy mají čárkovité, buď jen přízemní, nebo také lodyžní. Květy jsou oboupohlavní se spodním semeníkem, jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích. Plodem je tobolka nebo bobule. Čeleď zahrnuje řadu rodů, mezi nejvýznamnější patří: *Leucojum, Galanthus, Narcissus, Crinum, Amaryllis* a *Clivia*. Rostliny těchto rodů patří mezi obecně známé trvalky, rostou volně v přírodě střední a jižní Evropy nebo se pěstují pro okrasu.[31]

3.2.1 Charakteristika alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

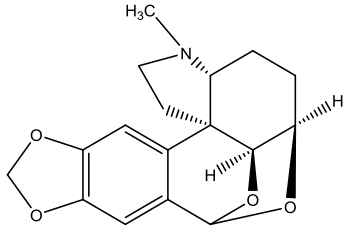
Doposud bylo z této čeledi izolováno více než 500 strukturálně odlišných alkaloidů, tzv. Amaryllidaceae alkaloidů. O těchto alkaloidech bylo pomocí moderních farmakologických studií zjištěno, že vykazují různou farmakologickou aktivitu.[32]

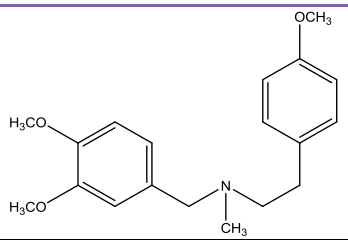
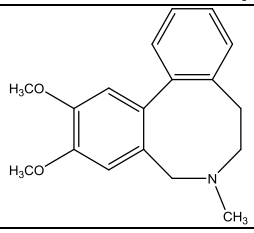
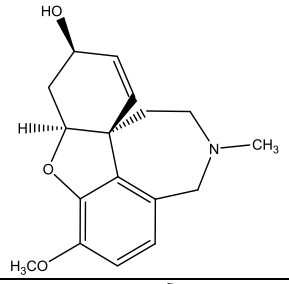
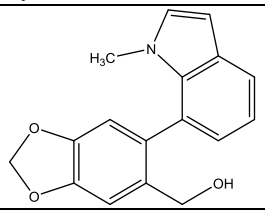
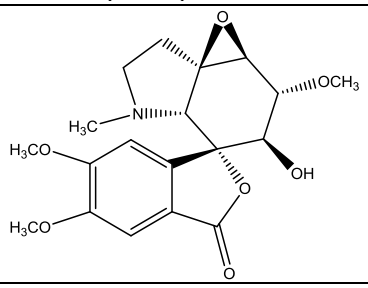
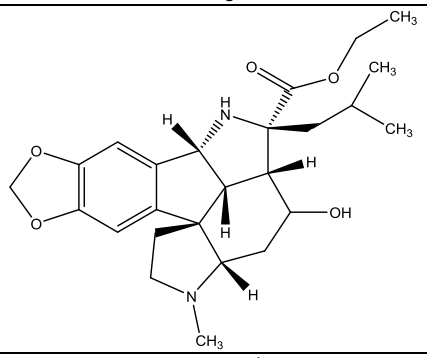
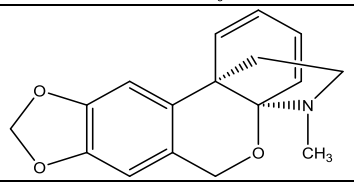
Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou k léčeným účelům používány již tisíce let. Jejich alkaloidní extrakty jsou předmětem aktivního chemického zkoumání posledních téměř 200 let. Jako první byl izolován lykorin z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877. Během posledních tří dekád byly mnohé z nich izolovány, testovány na biologickou aktivitu i syntetizovány různými výzkumnými skupinami.[33]

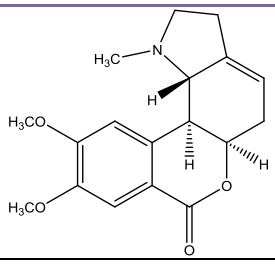
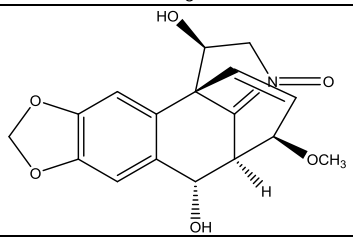
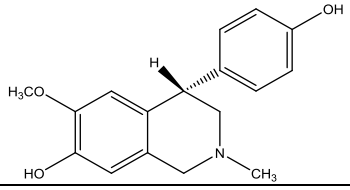
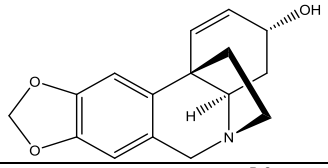
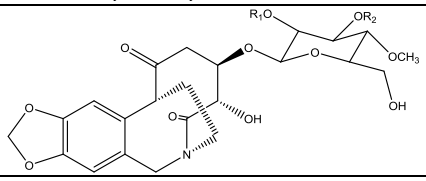
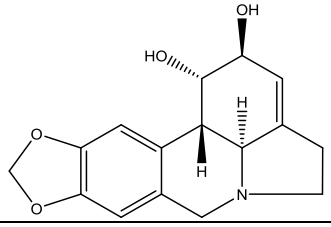
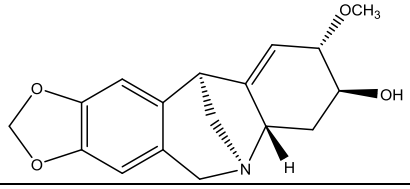
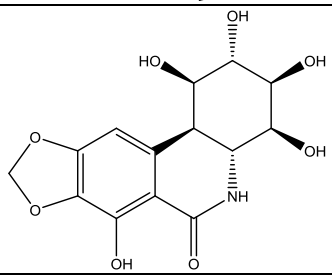
3.2.2 Klasifikace alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

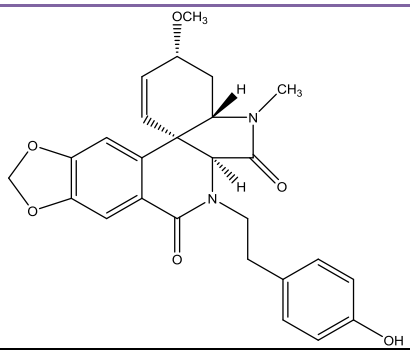
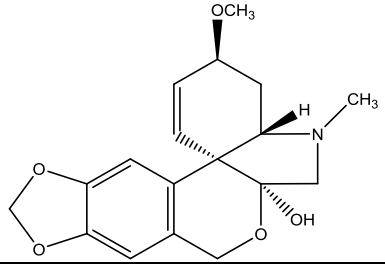
Amaryllidaceae alkaloidy jsou dle původního Ghoshalova modelu rozděleny do 9 hlavních skupin, mezi hlavní zástupce patří: norbelladin, lykorin, homolykorin, krinin, hemanthamin, narciklasin, tazettin, montanin a galanthamin.[34] Dle novějších zdrojů je možno je rozdělit do 18 strukturních skupin, uvedených v tabulce I.

Tabulka I: Struktrurní typy alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae [35]

Strukturní typ	Název alkaloidu	Vzorec alkaloidu	Zástupci
Augustaminový	Augustamin		*Crinum*

Belladinový	Belladin		*Crinum, Nerine*
Buflavinový	Buflavin		*Boophane*
Galanthaminový	Galanthamin		*Crinum*, *Hymenocallis*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcisssus*
Galanthindolový	Galanthindol		*Galanthus, Lycoris*
Galasinový	Galasin		*Galanthus,* *Hosta plantaginea*
Gracilaminový	Gracilamin		*Galanthus*
Gracilinový	Gracilin		*Galanthus*

Homolykorinový	Homolykorin		*Clivia*, *Galanthus, Haemanthus, Lycoris, Narcissus*
Hostasininový	Hostasinin		*Hosta plantaginea*
Cheryllinový	Cheryllin		*Crinum*
Krininový	Krinin		*Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Nerine, Narcissus*, *Hymenocallis (dříve Pancratium)*
Kripowellinový	Kripowellin A (R_1, R_2 =-CH_2OCH_2-) Kripowellin B (R_1 = R_2 = CH_3)		*Crinum*
Lykorinový	Lykorin		*Amaryllis*, *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Hisppeastrum*, *Hymenocallis*, *Leucojum*, *Narcissus, Zephyranthes*
Montaninový	Montanin		*Boophane*, *Haemanthus*, *Hymenocallis*, *Narcissus*
Pankratistatinový	Pankratistatin		*Crinum, Hippeastrum*

Plikaminový	Plikamin		*Cyrtanthus*, *Galanthus, Hymenocallis, Zephyranthes*
Tazettinový	Tazettin		*Crinum*, *Eucharis*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*

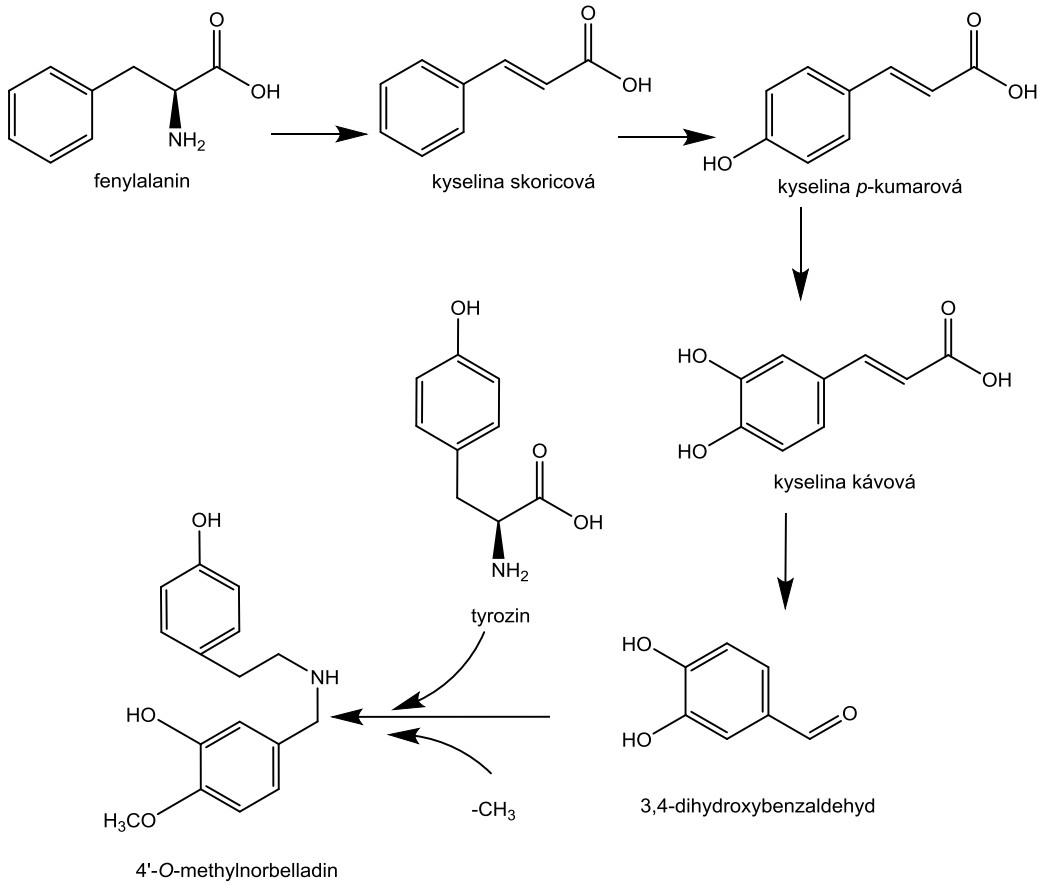
3.2.3 Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Aromatická aminokyselina L-tyrozin je prekurzorem velkého počtu alkaloidů s různou velikostí molekuly. Pochází ze šikimátové cesty a proto lze fenylpropanový skelet najít v tisících alkaloidů. Navzdory rozdílnosti jejich struktur vznikají pouze pěti základními biochemickými cestami: emetinová, autumnalinová, benzyltetrahydroisochinolinová, meskalin/isochinolinová a norbelladinová.[36]

Norbeladinová cesta

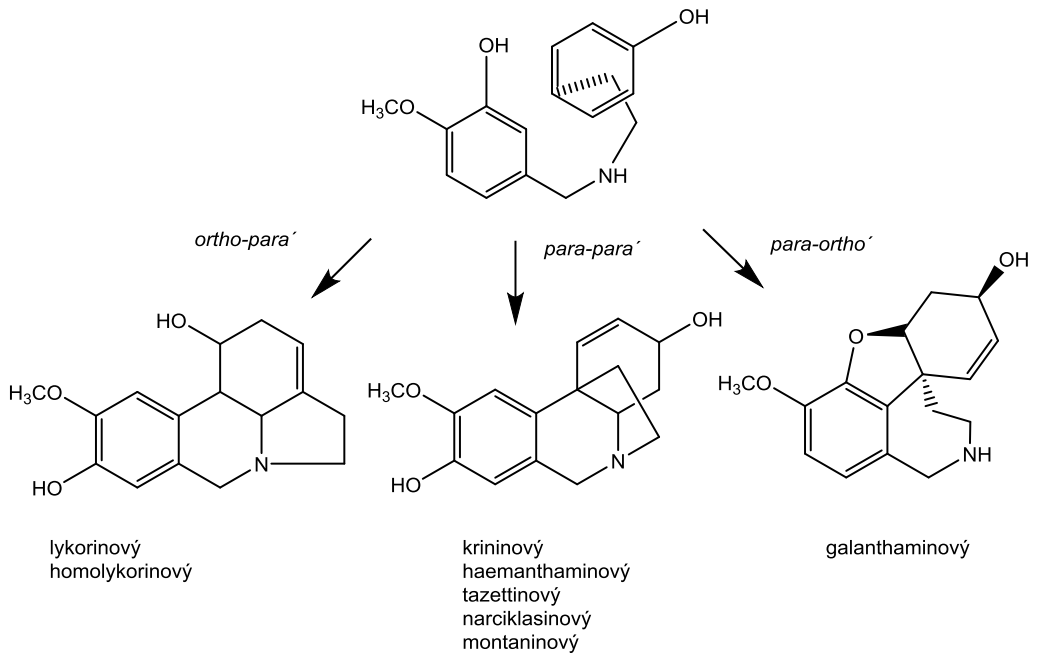
Norbelladinová cesta je specifická biosyntetická cesta pro vznik více než 400 alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae, zejména rodů *Crinum, Galanthus, Leucojum, Lycoris* a *Narcissus*. Jejich biosyntéza vychází z L-tyrosinu a L-fenylalaninu.[36]

Amaryllidaceae alkaloidy vznikají jako produkt intramolekulárního oxidativního spřažení s prekurzorem C_6C_2-N-C_1C_6 typu. Jak je vidět na obrázku C_6C_1- jednotka pochází z molekuly fenylalaninu, zatímco tyrozin dodá -N-C_2C_6 jednotku. Fenylalanin je přeměňován na kyselinu kávovou přes kyseliny skořicovou a *p*-kumarovou. Ztráta 2 atomů uhlíku má za následek vznik 3,4-dihydroxybenzaldehydu, který reaguje s tyrozinem v reakci, která zahrnuje i methylaci, vzniká jako produkt 4´-*O*-methylnorbelladin.[37]



Obr. 1: Vznik 4´-*O*-methylnorbelladinu[37]

Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká ze 4´-*O*-methylnorbelladinu osm základních struktur alkaloidů:



Obr. 2: intramolekulární oxidativní spojení [33]

3.2.4 Rod *Narcissus*

3.2.4.1 Taxonomické zařazení *Narcissus jonquilla*

Tabulka II: Taxonomické zařazení rodu *Narcissus*[38]

Taxon	Latinský název	Český název
Říše	*Plantae*	rostliny
Oddělení	*Magnoliophyta*	krytosemenné
Třída	*Liliopsida*	jednoděložné
Řád	*Asparagales*	chřestotvaré
Čeleď	*Amaryllidaceae*	amarylkovité
Rod	*Narcissus* L.	narcis
Druh	*Narcissus jonquilla* L.	narcis jonquilla

3.2.4.2 Popis

Narcis je jednou z nejznámějších cibulovin. Do tohoto rodu je řazeno 50 až 70 druhů původem z Evropy, ze severní Afriky a Blízkého východu, které v některých částech Evropy i zplaňují. V ČR se původní divoce rostoucí narcisy nevyskytují.

Narcisové cibule o velikosti mezi 0,6 až 10 cm; mají různě výrazný krk. Dužnaté suknice jsou uzavřené v hnědé slupce, která zabraňuje vyschnutí. Kolem cibule se tvoří malé cibulky, které jsou zprvu spojeny s mateřskou cibulí.

Stvoly se nevětví, jsou více či méně zploštělé a bezlisté. List narcisu je úzký, čárkovitý a většinou trochu stočený kolem své podélné osy, čímž si drží vzpřímený vzrůst.

Květy vyrůstají jednotlivě nebo ve zdánlivém okolíku, někdy dvoubarevné, obvykle převislé, ale mohou být i vzpřímené až zcela převislé. Charakteristický vzhled narcisového květu spočívá ve dvou výrazných tvarech. Šest okvětních plátků je rozděleno do dvou přeslenů – tři plátky vnějšího přeslenu jsou o něco větší než tři vnitřní a dohromady jsou na bázi spojené v trubku, která se dále opět rozděluje, rozšiřuje a tvoří širokou, plochou část květu. V ústí trubky vyrůstá převážně srostlá část, která vyčnívá nad okvětní plátky a tvoří velkou trubkovitou nebo talířovitou pakorunku. Lístky okvětí mohou mít stejnou barvu jako pakorunka, mohou se lišit jen odstínem nebo mít zřetelně odlišnou barvu. Vyskytují se odstíny od bílé až k temně žluté nebo od ostře oranžové až po meruňkově růžovou. Vedle

botanických druhů a kultivarů existují narcisy krátko- a dlouhokorunné, trubkovité, plno- i vícekvěté a další[39, 40].

Narcissus jonquilla L.

Narcisy druhu jonquilla mají původ v západní části Středomoří. Z oválných cibulí vyrůstají 20-30 cm vysoké květní stonky, listy mají stejnou délku. Kvetou v dubnu. Květy rostou po 2 až 6 a měří 3-5 cm. Charakteristickým znakem hybridů *jonquilla* je, že příjemně voní. Narcisům jonquilla vyhovuje výsluní.[40]

Narcissus jonquilla L. cv. Sundial

Byl zaveden roku 1955. Na stoncích vysokých 15 cm se tvoří 1 až 3 květy. Okvětí je světle žluté, pakorunka tmavě žlutá.

Narcissus jonquilla L. cv. Sundisc

Malý narcis o výšce 15-20 cm. Na stonku se tvoří pouze jeden květ téměř kulatého tvaru. Je žlutý, při odkvětu bledne do světle žluta.

Narcissus jonquilla L. cv. Sweetness

Byl zaveden roku 1939. Narcis vysoký 40 cm má zlatožluté okvětní lístky vybíhající do široké špičky a žlutou pakorunku. Květy jsou vonící, pevné stonky měří 35 cm.[40]

Obr. 3: *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness [41]

Narcissus jonquilla L. cv. Waterperry

Pěstuje se od roku 1953. Okvětní lístky tohoto 40 cm vysokého narcisu mají barvu slonoviny, na okrajích přecházejí do jemně žluté. Dlouhá úzká pakorunka je zlatožlutá, při odkvětu růžová. Na stonku vysokém 40 cm se tvoří 2 až 3 květy.[40]

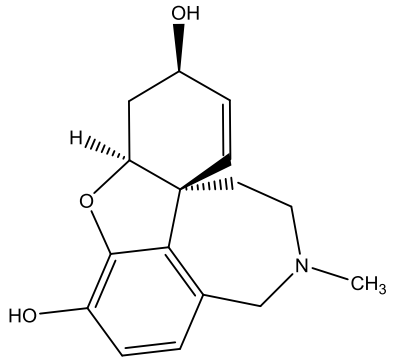
Obr. 4: *Narcissus jonquilla* L. cv. Watterpery [42]

Obsahové látky a jejich biologický účinek

Obsah galanthaminu se mezi jednotlivými kultivary významně liší. Některé tedy mohou být využity jako vhodný zdroj galanthaminu ve farmaceutickém průmyslu, jiná naopak nevykazují ani stopy této látky.

Neexistuje přímá korelace mezi obsahem galanthaminu a cholinesterázové inhibiční aktivity. Tato vlastnost může být zapříčiněna i obsahem sanguininu.[43]

Sanguinin vykazuje vyšší inhibiční aktivitu než galanthamin (až desetinásobnou). 11-hydroxygalanthamin vykazuje obdobnou aktivitu jako galanthamin.[44]



Obr. 5: Sanguinin

U některých kultivarů *Narcissus jonquilla* L., studovaných v této práci, byla již dříve biologická aktivita a obsah alkaloidů stanoveny. Zjištěné hodnoty sou uvedeny v tabulce III.

Tabulka III: Obsah galanthaminu a alkaloidů a jejich inhibiční cholinesterázová aktivita ve vybraných kultivarech *Narcissus jonquilla* L. [43]

kultivar	**Obsah galanthaminu (µg na g sušiny ± SD)**	**Celkový obsah alkaloidů (µg na g sušiny ± SD)**	**Inhibiční AChE aktivita IC_{50} (mg sušiny/ml ± SD)**
Sundial	20,31 ± 0,77	1685,74 ± 32,14	-
Sundisc	227,64 ± 1,53	227,64 ± 1,53	3,757 ± 0,080
Simplex	889,69 ± 4,02	2797,65 ± 26,75	2,340 ± 0,22

Z obdobné práce, kde byly zkoumány různé druhy a variety právě rodu *Narcissus* se zaměřením na esterázovou inhibiční aktivitu a identifikaci alkaloidů, vykazoval velmi slibnou aktivitu např. *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol (IC_{50} 3,3 ± 0,5 µg/ml).[45]

3.3 Biologické aktivity alkaloidů rodu *Narcissus*

Tato část se věnuje přehledu biologických vlastností vybraných alkaloidů rodu *Narcissus*, respektive Amaryllidaceae alkaloidů. V současné době je registrován pouze galanthamin. Ale biologické působení můžeme pozorovat u mnoha alkaloidů z této čeledi a proto mohou být perspektivní z hlediska jejich dalšího terapeutického využití. Látky jsou rozřazeny dle strukturních typů alkaloidů Amaryllidaceae popsaných dříve.

3.3.1 Galanthaminový typ

Alkaloidy spadající do této skupiny mají jako strukturní základ dibenzofuran a vznikají intramolekulárním oxidativním spojení *para-ortho´.* Nejdůležitějším zástupcem této skupiny z pohledu medicínského významu je galanthamin.[33] Přehled biologických aktivit alkaloidů galanthaminového typu je uveden v tabulce IV.

Tabulka IV: Biologické aktivity vybraných alkaloidů

Název	**Biologická aktivita**	**Literatura**
Galanthamin	Hypotenzivní	46
Galanthamin	Inhibice cholinesteráz (AChE)	23
Galanthamin	Neuroprotektivní	47
Galanthamin	Ovlivnění membránových iontových procesů	48
Galanthamin	Reverzní činidlo v anestezii	49
Galanthamin	Účinný proti únavovému syndromu	48
Sanguinin	Inhibice cholinesteráz (inhibice AChE vyšší než u galanthaminu)	44

3.3.2 Homolykorinový typ

Do této strukturní skupiny se řadí celá řada alkaloidů, ale jen některé mají výraznou biologickou aktivitu. Tyto alkaloidy jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. Při vzniku těchto struktur se uplatňuje *ortho-para´* intramolekulární oxidativní spojení. K homolykorinovému typu řadíme sloučeniny homolykorin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin.[33] Přehled biologických aktivit alkaloidů homolykorinového typu je uveden v tabulce V.

Tabulka V: Biologické aktivity vybraných alkaloidů

Název	**Biologická aktivita**	**Literatura**
8-*O*-demethylhomolykorin	Hypotenzivní efekt u normotenzních krys	50
8-*O*-demethylhomolykorin	Vazba na DNA	51
Dubiusin	Vazba na DNA	51
Hippeastrin	Antifungální	52
Hippeastrin	Antimykotický vůči *Candida albicans*	33
Hippeastrin	Antivirotický vůči *Herpes simplex*	53
Hippeastrin	Cytotoxická, protinádorová	33
Homolykorin	Cytotoxická, protinádorová	33
Homolykorin	Hypotenzivní efekt u normotenzních krys	46
Homolykorin	Inhibice cholinesteráz (AChE)	54
Lykorenin	Analgetická	34
Lykorenin	Cytotoxická, protinádorová	33
Lykorenin	Hypotenzivní efekt u normotenzních krys	46
Lykorenin	Vazba na DNA	51

3.3.3 Krininový typ

Látky řazené ke krininovému typu struktury, odpovídají podle jiných rozdělení haemanthaminovému a krinanovému typu. Do této skupiny patří haemanthamin, haemathidin, krinamin, maritidin a papyramin. Zmíněné látky jsou odvozené od 5,10b-ethanofenanthridinu[55] a vznikají intramolekulárním oxidativním spojením *para-para´*.[33] Přehled biologických aktivit alkaloidů krininového typu je uveden v tabulce VI.

Tabulka VI: Biologické aktivity vybraných alkaloidů

Název	**Biologická aktivita**	**Literatura**
Haemanthamin	Antimalarická	56, 57
Haemanthamin	Inhibitor buněčného růstu a induktor apoptózy u nádorových buněk	1, 58, 59, 60, 61
Haemathidin	Analgetická	62
Haemathidin	Antimalarická vůči *Plasmodium falciparum*	57
Haemathidin	Induktor apoptózy u nádorových buněk	58
Haemathidin	Protinádorová	1, 63, 61
Haemathidin	Protizánětlivá	64
Krinamin	Antibakteriální vůči *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*	65
Krinamin	Induktor apoptózy u nádorových buněk	59
Krinamin	Protinádorová	60

3.3.4 Lykorinový typ

Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří mezi nejznámější a z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin, dále sem patří také galanthin a pseudolykorin. Základní strukturu tvoří pyrollofenanthridinový cyklický alkaloid. Při vzniku těchto struktur se uplatňuje *ortho-para´* intramolekulární oxidativní spojení.

Do skupiny alkaloidů lykorinového typu spadají i další látky podobné struktury. Z biologicky nejzajímavějších uveďme karanin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-*O*-acetyllykorin, lykorin-2-on, amarbellisin a galanthin. Všechny výše uvedené vykazují protinádorovou aktivitu, avšak podle pilotních experimentů je nejúčinnější amarbellisin a pseudolykorin.[33] Přehled biologických aktivit alkaloidů lykorinového typu je uveden v tabulce VII.

Tabulka VII: Biologické aktivity vybraných alkaloidů

Název	**Biologická aktivita**	**Literatura**
Galanthin	Inhibice cholinesteráz (AChE)	66
Lykorin	Analgetická	62
Lykorin	Antimalarická	56
Lykorin	Antimykotická vůči *Candida albicans*	52
Lykorin	Antimykotická vůči *Saccharomyces cerevisiae*	67
Lykorin	Antiparazitická	56
Lykorin	Antiparazitická vůči *Trypanosoma brucei*	68
Lykorin	Antivirová	69, 70, 71, 72
Lykorin	Cytotoxická vůči *Trichomonas vaginalis*	73
Lykorin	Cytotoxická a antiproliferační	3
Lykorin	Hepatoprotektivní v dávce 2,0 $mg.kg^{-1}$	74
Lykorin	Inhibice cholinesteráz (AChE)	75
Lykorin	Inhibitor rostlinného růstu	76
Lykorin	Protinádorová	77, 72
Lykorin	Protizánětlivá	74, 78, 64
Pseudolykorin	Antivirová	69
Pseudolykorin	Protinádorová	1

3.3.5 Pankratistatinový typ

Alkaloidy této skupiny jsou deriváty odvozené od molekuly fenanthridinu.[33] Nejvýznamnějšími zástupci tohoto typu jsou narciklasin a pankratistatin. Narciklasin je

jedním z nejvýznamnějších antineoplastických alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae.[79] Přehled biologických aktivit alkaloidů pankratistatinového typu je uveden v tabulce VIII.

Tabulka VIII: Biologické aktivity vybraných alkaloidů

Název	**Biologická aktivita**	**Literatura**
Narciklasin	Antifungální	80
Narciklasin	Antivirotická	80
Narciklasin	Protinádorová	81
Narciklasin	Cytotoxický se specifitou k nádorovým buňkám	82
Pankratistatin	Cytotoxický se specifitou k nádorovým buňkám	82, 83
Pancratistatin	Protinádorová	81

3.3.6 Tazettinový typ

V této strukturní skupině se nacházejí deriváty odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu a vzniká intramolekulárním oxidativním spojením *para-para´*.

Pretazettin vzniká bisyntézou z haemanthidinu. Chemicky nestabilní prekurzor pretazzetin má mnohem výraznější biologické aktivity (antivirovou a protirakovinnou). Pokud se změní na tazettin dochází k výraznému snížení této biologické aktivity.[33] Přehled biologických aktivit alkaloidů tazettinového typu je uveden v tabulce IX.

Tabulka IX: Biologické aktivity vybraných alkaloidů

Název	**Biologická aktivita**	**Literatura**
Tazettin	Antimalarická	56
Tazettin	Cytotoxická	84
Tazettin	Hypotenzivní	46
Tazettin	Inhibice cholinesteráz (AChE)	75
Tazettin	Vazba na DNA	51

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace

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

4.1.2 Odpařování

Odpařování analytických vzorků drog pro přípravu extraktů bylo prováděno na vakuové odparce Rotavapor R 114 s vodní lázní Büchi Waterbath B-480 za sníženého tlaku a při teplotě nepřevyšující 40°C.

Odparky sumárních extraktů (ethanolový) a alkaloidních bazí (ethyl-acetátový) určené pro zjištění biologické aktivity byly následně rychle odpařovány v injekčních ampulkách (objem 5 ml) v proudu filtrovaného vzduchu na vodní lázni při teplotě max. 60 °C. Po odpaření rozpouštědel byly ampulky přeneseny do exsikátoru a sušeny ve vakuu (10mmHg) po dobu 24 hodin nad perlami silikagelu. Poté byl do ampulek napuštěn argon, zataveny a uchovávány do doby analýzy při snížené teplotě (-22 °C).

4.2 Materiál a vybavení pro přípravu extraktů

4.2.1 Rozpouštědla

Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem (Lihovar Kolín)

Ethylacetát, p. a. (Penta)

Methanol 1mg/ml LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

4.2.2 Chemikálie

Křemelina Celite C 535 Jonh´s Manville (Sigma-Aldrich)

Síran sodný bezvodý č. (Penta)

Uhličitan sodný 10% roztok (w/w) (Lachema)

Kyselina sírová 2%, p. a. (Penta)

4.3 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza

4.3.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule rostlin *Narcissus jonquilla* L. různých kultivarů (Sundial, Sundisc, Sweetness, Waterperry, Simplex, Twinkling Yellow, Yazz) byly zakoupeny od firmy LUKON BULBS (ČR) doba sběru cibulí byla v červnu až červenci.

Tabulka X: Hmotnosti vzorků použitých při extrakci

Číslo vzorku*	**Taxon**	**Hmotnost****
AL-493	*Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial	42 g
AL-494	*Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc	162 g
AL-496	*Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness	187 g
AL-497	*Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry	187 g
AL-510	*Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex	48 g
AL-511	*Narcissus jonquilla* L. cv. Twinkling Yellow	52 g
AL-518	*Narcissus jonquilla* L. cv. Yazz	251 g

* číslo vzorku z katalogizace pracovní skupiny ADINACO Group

** hmotnost vzorku použitá k extrakci

4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Suché části rostlin (cibule) byly rozemlety na částice o velikosti ca 2 mm. Takto upravená droga byla po dobu 15 minut extrahována 95% ethanolem (za varu, na vodní lázni, se zpětným chladičem). Následně se směs nechala zchladnout a zfiltrovala se přes filtr z vliselinu a poté přes vrstvičku křemeliny ve filtračním tubusu, tento extrakční postup byl proveden u každého vzorku celkem třikrát. Dále bylo provedeno odpařování filtrátu ve vakuové odparce do malého suspenzního zbytku, který byl smíchán s 20 ml 2% kyseliny sírové a umístěn do ultrazvukové lázně SONOREX při normální teplotě a stupni 10 po dobu 5 minut. Tekutina byla zfiltrována přes tenkou vrstvu křemeliny a zředěna vodou na ca 50 ml a vytřepána třikrát předestilovaným a nestabilizovaným diethyletherem. Oddělená vodná kyselá vrstva se alkalizovala 10% uhličitanem sodným na pH 10 a vytřepáním alkaloidních bazí předestilovaným ethylacetátem (třikrát) byl zhotoven alkaloidní extrakt. Stopy vody byly odstraněny bezvodým síranem sodným a následnou filtrací. Z každého alkaloidního extraktu byly odebrány 2 vzorky, které po odpaření do sucha měly hmotnost cca 10 mg pro testování biologické aktivity a cca 1 mg pro analýzu GC/MS. Zbytek extraktu je uchováván v zatavené ampulce. Vzorky byly umístěny do exsikátoru se silikagelem (sušícími perlami).

4.3.3 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

Alkaloidy z rostlin *Narcissus jonquilla* L. byly identifikovány s využitím plynového chromatografu (Agilent Technologies 7890A) s Triple-Axis hmotnostním detektorem (Agilent Technologies 5975C). Nástřik byl proveden při 280°C v objemu 1 µl a split s poměrem 15:1. Dělení směsi proběhlo na koloně Agilent Technologies HP-5MS, 30m x 0,250 mm při teplotním programu 15°C/min ze 100°C na 180°C, 1 min na 180 °C, 5°C/min ze 180°C na 300°C, 40 min na 300°C. Průtok nosného plynu He 5.0 (Linde) 0,8 ml/min. Ionizace proběhla při 230°C elektrony 70 eV a detekovány byly fragmenty v rozmezí 40-600 m/z.

Alkaloidy byly identifikovány pomocí porovnávání jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty v literatuře a se standardy izolovaných v naší laboratoři.

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuchE

4.4.1 Materiál a vybavení pro přípravu cholinesterasové aktivity (včetně přípravy erythrocytárních pouzder)

4.4.1.1 Chemikálie:

10mM Acetylthiocholin-jodid (Sigma-Adrich)

10mM Butyrylthiocholin-jodid (Sigma-Adrich)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)

5mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma-Aldrich)

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

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai´an zhonghui Plant Biochemical Company, Ltd., China)

Pufry:

5mM Fosfátový pufr (pH 7,4)

5mM Fosfátový pufr obsahující 150 mM chloridu sodného (pH 7,4)

100mM Fosfátový pufr (pH 7,4)

4.4.1.2 Biologický materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterázy (HuAChE) byl použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy (HuBuChE) byla lidská plazma.

4.4.2. Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

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

4.4.1.3 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocyty se získají z čerstvé lidské krve (v poměru citran sodný:krev 1:9). Po odběru se provede centrifugace krve (centrifuga Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611, rychlost 4000 otáček/min, 4 °C, 10 minut). Po této první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nebyly erytrocyty, a uchovává se do doby stanovení aktivity BuChE při 4 °C.

500 µl plazmy se odebere zvlášť, dále se uchovává při normální teplotě za nepřístupu světla do doby stanovení aktivity (ne déle než 1 hodinu). Po stanovení absorbance u plazmy se před rozplněním do mikrozkumavek provede filtrace přes slabou vrstvu buničité vaty.

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu se opatrně odsál a odečetl se objem erytrocytů. Následně byl sediment zředěn 5mM fosfátovým pufrem pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného. Suspenze byla promíchána a byla provedena centrifugace (viz oddělování plazmy). Promytí tímto způsobem (odstranění zbytků plazmy s BuChE) bylo provedeno celkem 3x a poté byla promývací kapalina dokonale odstraněna. Po tomto promytí bylo přidáno takové množství 5mM fosfátového pufru pH 7,4 (bez chloridu sodného), aby byl objemový poměr erytrocyty:pufr 1:9, směs se opět homogenizovala překlápěním zkumavek, byla přelita do Erlenmayerovy baňky a erytrocyty se ponechaly spontánně hemolyzovat po dobu 10 minut za míchání při 300 otáčkách/min. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se u suspenze stanovila aktivita, eventuelně se případně naředěná suspenze dispendovala do mikrozkumavek PP (2 ml, Eppendorff PCR) v příslušném objemu a do doby použití se uchovávala při -22 °C.

4.4.2 Podmínky měření

Experiment byl uskutečněn za těchto podmínek:

- teplota: 37 °C

- prostředí: 67 µl DTNB, 8.3 µl rozpouštědla použitého pro ředění vzorku (DMSO), 215 µl 100mM fosfátového pufru a 33.5 µl roztoku substrátu.

- vlnová délka spektra: 436 nm

- využití mikrotitračních destiček

4.4.3 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC_{50})

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB).[85]

Do jamek mikrotitračních destiček bylo u slepého vzorku napipetováno 8,3 µl plazmy nebo pouzder lidských erytrocytů, přidalo se DTNB, rozpouštědlo pro ředění vzorku (DMSO), 100mM fosfátový pufr a roztok substrátu.

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.

U měřených látek (extraktů) se použily stejné objemy činidel a roztoku substrátu. Místo samotného rozpouštědla se přidávaly roztoky měřené látky o různé koncentraci (40,0; 10,0; 4,0; 1,0; 0,4, v DMSO, případně nižší) či roztoky extraktů o různé koncentraci (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml, případně nižší).

Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu (kinetický mód, 7 měření). Hodnoty IC_{50} byly získány 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). Výsledné hodnoty byly porovnány s IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz (galanthaminem a huperzinem A, eserinem). Procenta inhibice byla počítána dle vzorce $\% I = 100-(\Delta ABL/\Delta ASA)*100$, kde ΔABL je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔASA je nárůst absorbance měřeného vzorku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Již dříve bylo provedeno několik studií s různými kultivary *Narcissus jonquilla* L., které se zaměřovaly na obsahové látky. Mezi prvními prácemi věnované druhu *Narcissus jonquilla* L. byl analyzován kultivar cv. Golden sceptre obsahující především galanthamin, lykorenin, haemanthamin, hippeastrin a tazettin. Minoritně tento vzorek obsahoval také homolykorin, masonin a poetaricin.[86]

Obdobné složení bylo zjištěno i u 4 variet *Narcissus jonquilla* L. v další analýze. Konkrétně se jednalo o následující alkaloidy: galanthamin, tazettin, lykorin, hippeastrin, odulin, haemanthamin, homolykorin a lykorenin.[87]

A jedna z nejnovějších studií *Narcissus jonquilla* L. cv. Quail udává obsah především haemanthaminu, lykorinu a narciklasinu.[88]

Výše uvedené sloučeniny se hojně vyskytovaly i v extraktech analyzovaných v této práci.

V tabulce XI je uveden přehled biologické aktivity, respektive inhibičních koncentrací všech analyzovaných extraktů. Podrobněji jsou okomentovány v dalším textu.

Tabulka XI: Inhibice AChE a BuChE extraktů z morfologických částí vybraných taxonů (extrakty EtOAc)

Číslo vzorku	**Taxon**	**Morfologická část**	**IC_{50} extraktů ($\mu g.ml^{-1}$)**	
			AChE	BuChe
AL-493	*Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial	cibule	29,31 ± 4,87	130,20 ± 9,97
AL-494	*Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc	cibule	12,03 ±1,72	5,09 ± 0,64
AL-496	*Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness	cibule	13,42 ± 3,32	89,39 ± 10,35
AL-497	*Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry	cibule	6,53 ± 0,88	53,45 ± 7,33
AL-510	*Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex	cibule	17,60 ± 2,43	128,38 ± 15,67
AL-511	*Narcissus jonquilla* L. cv. Twinkling Yellow	cibule	19,52 ± 2,69	131,76 ± 15,71
AL-518	*Narcissus jonquilla* L. cv. Yazz	cibule	13,35 ± 1,99	95,05 ± 13,58

5.1 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial a jeho GC/MS analýza

Analýza kultivaru Sundial již byla dříve provedena,[43] byl zde stanoven obsah galanthaminu a alkaloidů obecně, biologická aktivita nebyla stanovena (viz Tabulka III).

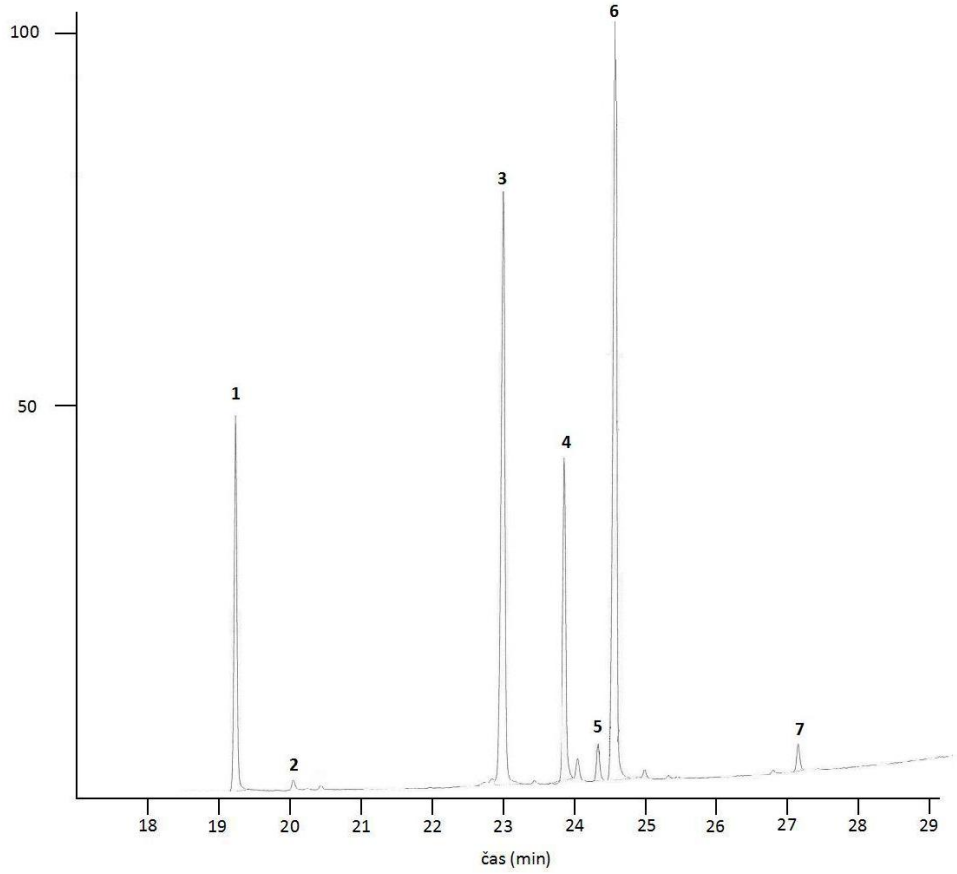
Na základě retenčního času jednotlivých složek, hmotnostních spekter a jejich porovnáním s údaji v literatuře se standardy se v tomto alkaloidní extraktu podařilo identifikovat 5 sloučenin (Tabulka XII). Nejhojněji byly zastoupeny látky lykorinového typu: galanthin, lykorin a inkartin. Dále i alkaloid galanthaminového typu galanthamin a tazettin patřící do typu tazettinového. Nepodařilo se identifikovat 2 látky, u první z nich A1 se dá dle hmotnostního spektra předpokládat, že se bude jednat o derivát krinanu. Chromatografický záznam alkaloidního profilu a strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů jsou zobrazeny na následujících obrázcích (6 a 7).

Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} byla 29,31 ± 4,87 $\mu g.ml^{-1}$, tedy nejslabší biologická aktivita ze zkoumaných extraktů. I inhibiční aktivitu vůči BuChE s hodnotou IC_{50} 130,20 ± 9,97 $\mu g.ml^{-1}$ řadíme k méně zajímavým. Sloučeniny lykorinového typu, které v tomto extraktu převažují, jsou slabší inhibitory cholinesteráz než alkaloidy galanthaminového typu.

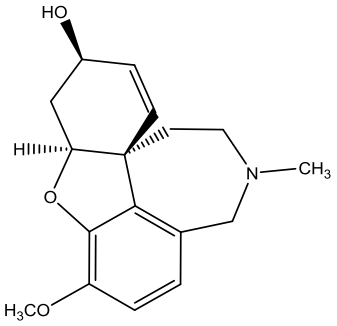
Tabulka XII Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	**RT [a] (min)**	**[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)**	**%**	**Reference pro MS**
1 Galanthamin	19,31	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	13	NIST 11
2 A1[c]	20,10	287(100), 272(45), 256(45), 217(80), 203(25)	1	-
3 Tazettin	23,01	331(25), 298(20), 247 (100), 201(20), 115(20), 70(25)	29	NIST 11
4 Galanthin	23,86	317(23), 316(15), 284(13), 268(15), 243(80), 242(100)	14	NIST 11
5 Lykorin	24,31	287(25), 286(15), 268(20), 250(30), 227(65), 226(100)	2	NIST 11
6 Inkartin	24,54	333(45), 332(100), 296(20), 259(70), 258(90), 244(20)	40	NIST 11
7 A2 [C]	27,07	296(15), 295(85), 294(100), 278(10), 147(12)	1	-

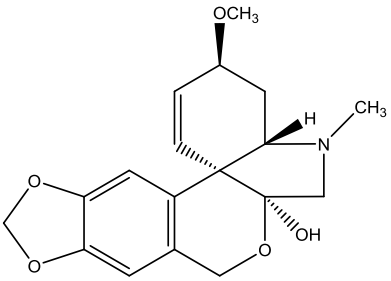
[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část [C] nebylo identifikováno



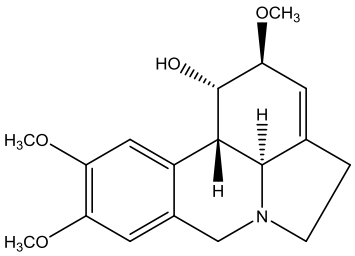
Obr. 6. Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial



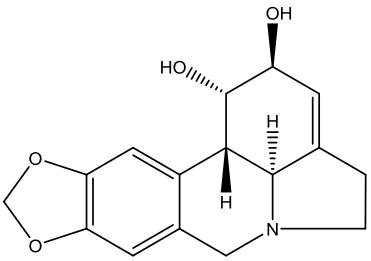
1 Galanthamin



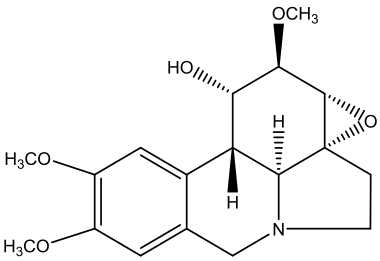
3 Tazettin



4 Galanthin



5 Lykorin



6 Inkartin

Obr. 7 Vybrané strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibule *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial

5.2 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc a jeho GC/MS analýza

Alkaloidnímu profilu dominuje galanthamin. Extrakt kultivaru Sundisc obsahoval ještě lykorin a dva blíže neurčené homolykorinové deriváty obsahující ve spektru charakteristický iont s hodnotou 109. Další látky neuvedené v tabulce identifikovaných alkaloidů (Tabulka XIII), ale zřetelné na chromatografickém záznamu (Obr. 8) nepatří mezi alkaloidy, proto nebyly vyhodnocovány. Jedná se o kontaminaci sloučeninami křemíku, vzniklou v průběhu extrakce.

Velmi slibné jsou hodnoty biologických aktivit. Hodnota inhibiční aktivity vůči AChE IC_{50} 12,03 ± 1,72 $\mu g.ml^{-1}$ je poměrně zajímavá. Výrazná inhibiční aktivita je pravděpodobně ovlivněna dominantním obsahem galanthaminu v množství 69 % TIC, nelze ovšem vyloučit,

že svůj podíl na nízké hodnotě biologické aktivity mají neidentifikované homolykorinové deriváty.

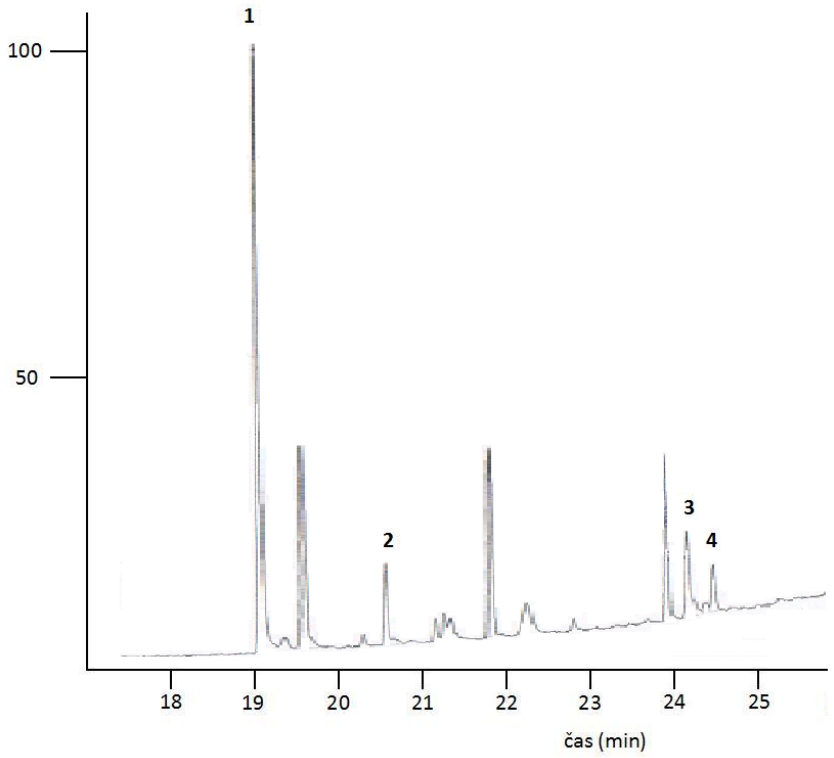
Předchozí fytochemická studie s *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc popsala také výraznou inhibiční aktivitu (IC_{50} kolem 3,8 mg sušiny/ml) a velmi významný podíl galanthaminu z celkového obsahu alkaloidů.[43]

Navíc vykazuje výrazně nejnižší hodnotu IC_{50} ze všech vzorků vůči BuChE: IC_{50} 5,09 ± 0,64 $\mu g.ml^{-1}$. Zatím bylo prozkoumáno pouze málo látek s ohledem na jejich inhibiční aktivitu vůči BuChE, proto nelze určit s jakými obsahovými látkami je aktivita přesně spojena.[89]

Tabulka XIII: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	**RT [a] (min)**	**[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)**	**%**	**Reference pro MS**
1 Galanthamin	19,19	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	69	NIST 11
2 A3 [C]	20,65	191 (20), 110 (20), 109 (100), 108 (25)	11	-
3 lykorin	24,18	287(25), 286(15), 268(20), 250(30), 227(65), 226(100)	14	NIST 11
4 A4 [C]	24,48	108 (30), 109 (100), 110 (20), 82 (15), 42 (15)	6	-

[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část [C] nebylo identifikováno



Obr. 8: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc

5.3 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness a jeho GC/MS analýza

O obsahových látkách a biologické aktivitě *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness doposud nebyla publikována žádná fytochemická studie.

V alkaloidním extraktu bylo identifikováno 6 alkaloidů. Nejvýrazněji byl zastoupen tazettin, představitel tazettinového strukturního typu, dále galanthamin s galanthaminovou strukturou a z lykorinového typu alkaloid karanin. Kultivar Sundisc obsahoval také lykoramin (galanthaminový typ). Lykoramin vykazuje nižší cholinesterázovou inhibiční aktivitu, což může souviset s chybějící dvojnou vazbou v cyklohexanovém kruhu. V důsledku toho se liší prostorovou konfigurací od sloučenin, které mají v tomto kruhu dvojnou vazbu a jsou silnější cholinesterázové inhibitory.[44]

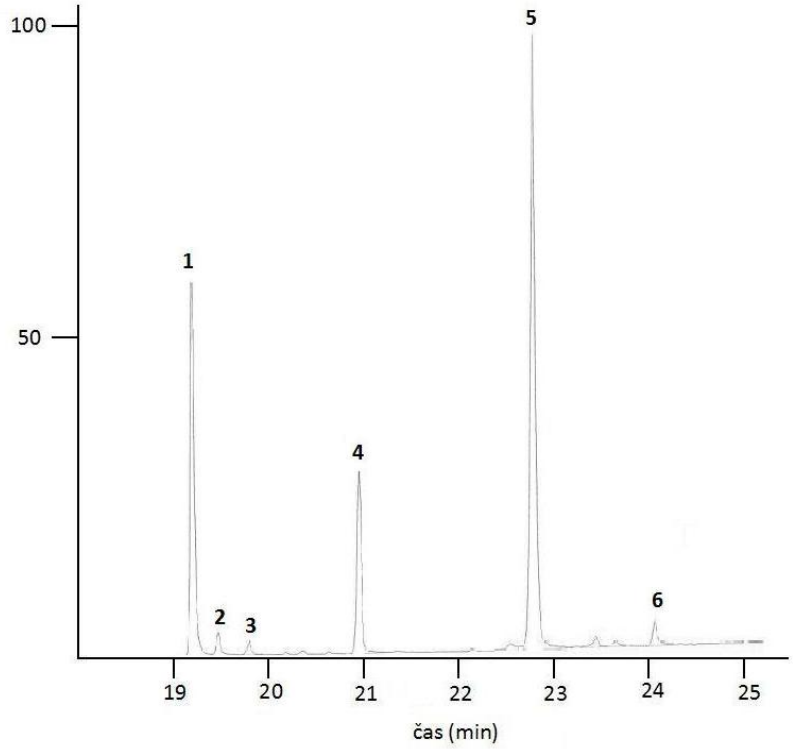
Dalšími zjištěnými alkaloidy byly lykorin (lykorinový typ) a lykoraminon (galanthaminový typ). Záznam GC/MS analýzy je shrnut v tabulce XIV, její chromatografický záznam a struktury některých alkaloidů jsou uvedeny na obrázcích 9 a 10.

Alkaloidní extrakt této rostliny vykazoval inhibiční aktivitu vůči AChE IC_{50} 13,42 ± 3,32 µg.ml^{-1} a vůči BuChE 89,39 ± 10,35 µg.ml^{-1}.

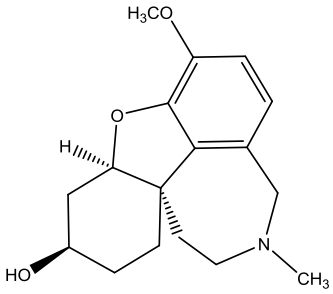
Tabulka XIV: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness a popis jejich hmotnostních spekter

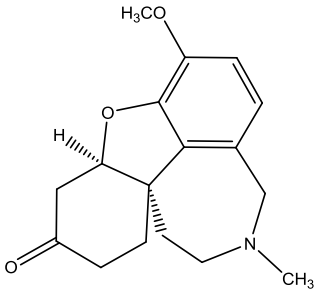
Sloučenina	**RT [a] (min)**	**[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)**	**%**	**Reference pro MS**
1 Galanthamin	19,19	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	27	NIST 11
2 Lykoramin	19,46	289 (60), 288 (100), 232 (10), 202 (15), 115 (15)	2	NIST 11
3 Lykoraminon	19,80	287 (65), 286 (100), 218 (15), 202 (25), 187 (15), 115 (15)	1	NIST 11
4 Karanin	20,99	271 (65), 270 (45), 252 (60), 250 (15), 227 (45), 226 (100)	14	NIST 11
5 Tazettin	22,88	331(35), 298(25), 247 (100), 115(20), 70(25), 44 (50)	54	NIST 11
6 Lykorin	24,18	287(25), 286(15), 268(20), 250(30), 227(65), 226(100)	2	NIST 11

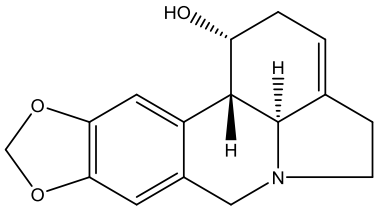
[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část



Obr. 9: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness







2 Lykoramin 3 Lykoraminon 4 Karanin

Obr. 10: Vybrané strukturní vzorce identifikovaných alkaloidů v extraktu z cibule *Narcissus jonquilla* L. cv. Sweetness

5.4 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry a jeho GC/MS analýza

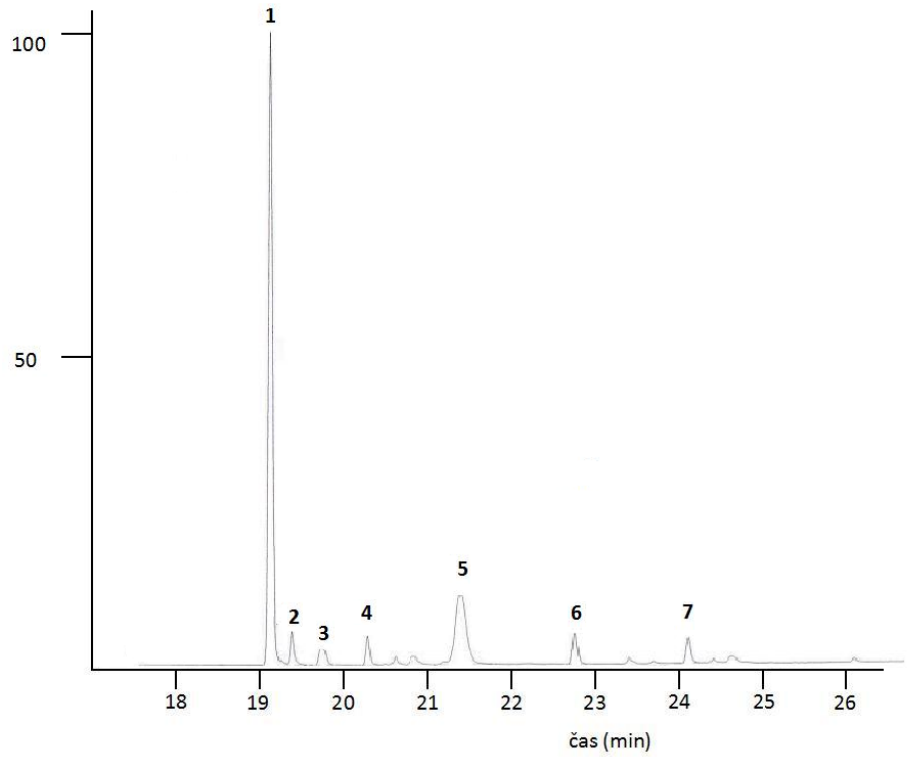
O této varietě rostliny *Narcissus jonquilla* L. zatím nebyla publikovaná žádná fytochemická práce. V extraktu bylo identifikováno několik sloučenin s prokázaným inhibičním účinkem vůči cholinesterázám: galanthamin[23], tazettin[75] a lykorin[75]. Obsaženy jsou i alkaloidy z tohoto hlediska méně účinné: lykoramin[44] a galanthaminon (Obr. 12). Z pěti identifikovaných byly 3 galanthaminového typu, 1 tazettinového a 1 lykorinového. Alkaloidy, které se opět nepodařilo přesně identifikovat, jsou velmi pravděpodobně homolykorinové deriváty. Přehled těchto alkaloidů je uveden v tabulce XV, chromatografický záznam na obrázku 11.

Nejzajímavější výsledek z analyzovaných vzorků ohledně inhibiční aktivity vůči AChE byl stanoven zde: 6,53 ± 0,88 $\mu g.ml^{-1}$ a jako poměrně zajímavou můžeme ohodnotit i IC_{50} vůči BuChE 53,45 ± 7,33 $\mu g.ml^{-1}$. Perspektivní biologickou aktivitu lze přikládat velkému množství galanthaminu a dalších látek s dobrou inhibiční aktivitou, které zde tvoří 73 % TIC.

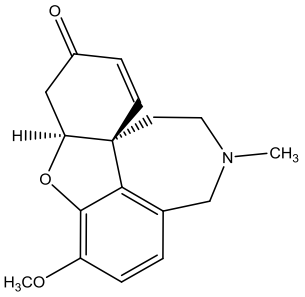
Tabulka XV: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	**RT [a] (min)**	**[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)**	**%**	**Reference pro MS**
1 Galanthamin	19,26	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	67	NIST 11
2 Lykoramin	19,48	289 (60), 288 (100), 232 (10), 202 (15), 115 (15)	4	NIST 11
3 A5 [C]	19,82	287 (60), 286 (80), 202 (20), 175 (15), 109 (100), 108 (20)	2	-
4 Galanthaminon	20,38	285 (80), 284 (100), 242 (20), 199 (25), 174 (35), 115 (20)	3	NIST 11
5 A6 [C]	21,48	283 (5), 110 (10), 109 (100), 108 (20), 44 (5)	18	-
6 Tazettin	22,86	331(35), 298(25), 247 (100), 115(20), 70(25), 44 (50)	3	NIST 11
7 Lykorin	24,20	287(25), 286(15), 268(25), 250(25), 227(65), 226(100)	3	NIST 11

[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část [C] nebylo identifikováno



Obr. 11: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry



4 Galanthaminon

Obr. 12: Vybraný strukturní vzorec alkaloidu identifikovaného v extraktu z cibule *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry

5.5 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex a jeho GC/MS analýza

Z alkaloidního extraktu bylo zjištěno 6 sloučenin (Tabulka XVI). Šlo především o alkaloidy lykorinového typu: lykorin, inkartin, galanthin a narcissidin, ale i dalších strukturálních typů jako je galanthamin a tazettin.

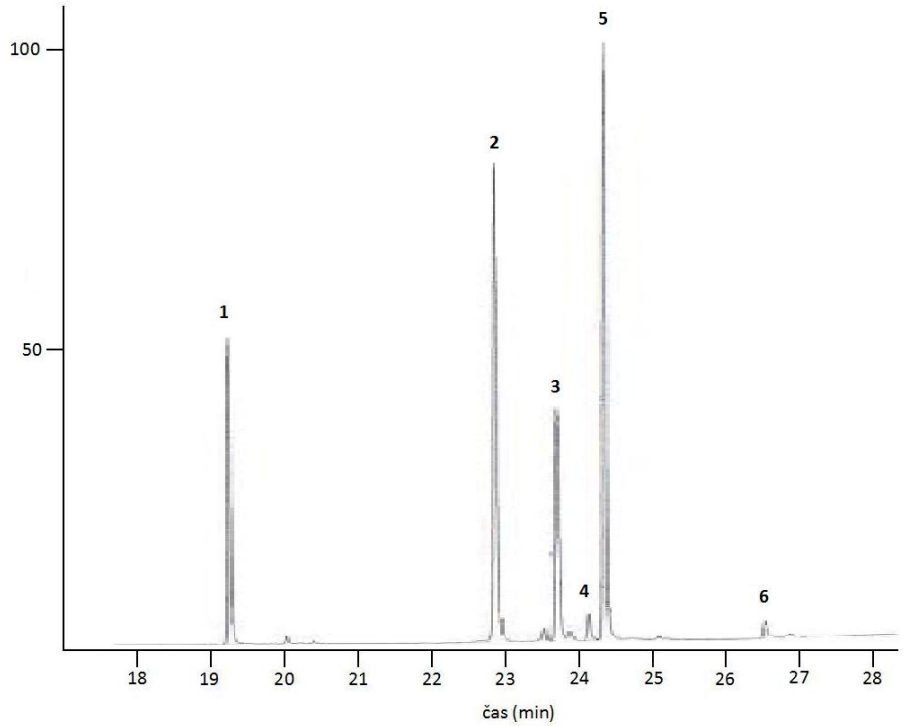
Předchozí fytochemická studie s *Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex dokládá inhibiční aktivitu IC_{50} kolem 2,3 mg sušiny/ml. [43]

Chromatografický záznam a struktury identifikovaných látek jsou zobrazeny na obrázcích 13 a 14. Inhibiční aktivita dosahuje hodnot IC_{50} vůči AChE 17,60 ± 2,43 $\mu g.ml^{-1}$ a IC_{50} vůči BuChE 128,38 ± 15,67 $\mu g.ml^{-1}$.

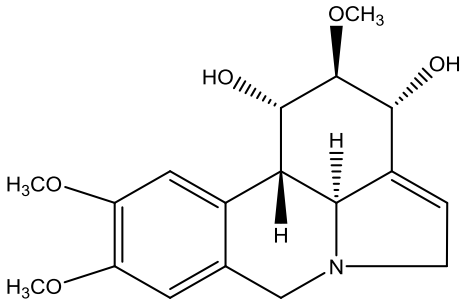
Tabulka XVI: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	**RT [a] (min)**	**[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)**	**%**	**Reference pro MS**
1 Galanthamin	19,20	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	15	NIST 11
2 Tazettin	22,89	331(35), 298(25), 247 (100), 115(20), 70(25), 44 (50)	33	NIST 11
3 Galanthin	23,73	317(23), 316(15), 284(10), 268(15), 243(85), 242(100)	13	NIST 11
4 Lykorin	24,20	287(25), 286(15), 268(25), 250(25), 227(65), 226(100)	2	NIST 11
5 Inkartin	24,43	333(45), 332(100), 296(25), 259(70), 258(90), 244(20)	36	NIST 11
6 Narcissidin	26,61	315 (55), 284 (100), 266 (40), 258 (45), 230 (55), 229 (45)	1	[90]

[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část



Obr. 13: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex



6 Narcissidin

Obr. 14 Vybraný strukturní vzorec identifikovaného alkaloidu v extraktu z cibule *Narcissus jonquilla* L. cv. Simplex

5.6 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Twinkling Yellow a jeho GC/MS analýza

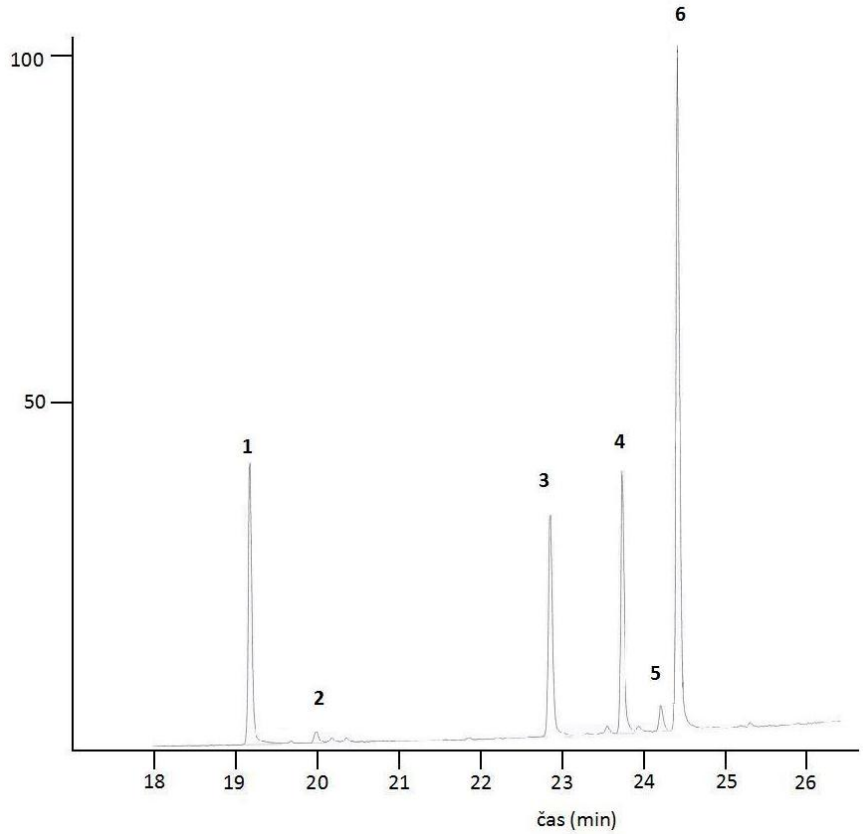
O této varietě rostliny *Narcissus jonquilla* L. zatím nebyla publikovaná žádná fytochemická práce. V rámci naší studie bylo identifikováno 5 alkaloidů. Nejvíce byl zastoupen inkartin (44 % TIC), poté galanthin, galanthamin a tazettin a minoritně i lykorin. Jedna ze sloučenin nebyla určena. Přehled je uveden v tabulce XVII a chromatografický záznam extraktu je zobrazen na obrázku 15.

Inhibiční aktivita tohoto vzorku byla určena IC_{50} vůči AChE 19,52 ± 2,69 $\mu g.ml^{-1}$ a IC_{50} vůči BuChE 131,76 ± 15,71 $\mu g.ml^{-1}$. Hodnotíme ji jako spíše méně zajímavou.

Tabulka XVII: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích *rostliny Narcissus jonquilla* L. cv. Twinkling Yellow a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	**RT [a] (min)**	**[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)**	**%**	**Reference pro MS**
1 Galanthamin	19,20	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	19	NIST 11
2 A7 [C]	20,00	287 (100), 272 (45), 256 (40), 217 (90), 203 (30), 116 (25)	1	-
3 Tazettin	22,87	331(35), 298(25), 247 (100), 115(20), 70(25), 44 (50)	17	NIST 11
4 Galanthin	23,73	317(23), 316(15), 284(10), 268(15), 243(85), 242(100)	17	NIST 11
5 Lykorin	24,18	287(25), 286(15), 268(25), 250(25), 227(65), 226(100)	2	NIST 11
6 Inkartin	24,41	333(45), 332(100), 296(40), 259(70), 258(90), 244(20)	44	NIST 11

[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část [C] nebylo identifikováno



Obr. 15: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* L. cv. Twinkling Yellow

5.7 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostlin *Narcissus jonquilla* L. cv. Yazz a jeho GC/MS analýza

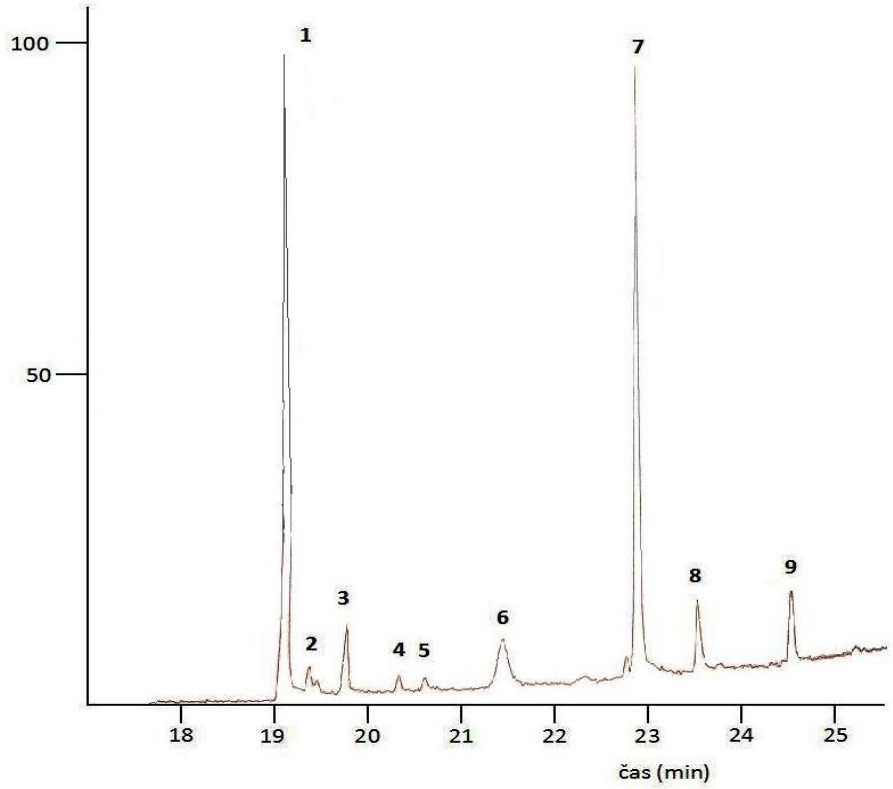
O této varietě rostliny *Narcissus jonquilla* L. zatím nebyla publikovaná žádná fytochemická práce. Vzorek obsahoval široké spektrum alkaloidů (Obr. 16), přesně identifikovat se podařilo pouze tři z nich. Dva jsou řazené mezi galanthaminové strukturální typy: galanthamin a lykoramin a jeden mezi tazettinový typ: tazetin. V tomto alkaloidním extraktu nebylo identifikováno velké množství látek s velmi obdobným spektrem MS, dá se předpokládat, že se jedná o homolykorinové deriváty (viz Tabulka XVIII). Pro jejich přesné určení by bylo nutné využít jiné metody jako je např. nukleární magnetické rezonance.

Alkaloidní extrakt vykazoval slibnou aktivitu vůči lidské acetylcholinesteráze, kde získaná hodnota IC_{50} byla 13,35 ± 1,99 $\mu g.ml^{-1}$ a vůči BuChE 95,05 ± 13,58 $\mu g.ml^{-1}$. Vzhledem k nadějné biologické aktivitě by bylo vhodné provést přesnější identifikaci, eventuelně izolaci jednotlivých alkaloidů a zkoušky biologické aktivity samotných sloučenin.

Tabulka XVIII: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *Narcissus jonquilla* L. cv. Yazz a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT [a] (min)	[M] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,14	287(80), 286(100), 244(25), 216(35), 174(35), 115(20)	34	NIST 11
2 Lykoramin	19,41	289 (60), 288 (100), 232 (10), 202 (15), 115 (15)	2	NIST 11
3 A8 [C]	19,79	283 (10), 222 (5), 175 (15), 110 (10), 109 (100), 108 (15)	4	-
4 A9 [C]	20,33	342 (20), 285 (80), 284 (100), 199 (25), 174 (30), 109 (65)	1	-
5 A10 [C]	20,60	341 (10), 191 (10), 109 (100), 108 (20)	1	-
6 A11 [C]	21,38	163 (5), 110 (10), 109 (100), 108 (50), 94 (5), 42 (5)	7	-
7 Tazettin	22,79	331(25), 298(20), 247 (100), 201(20), 115(20), 70(25)	42	NIST 11
8 A12 [C]	23,43	162 (5), 134 (5), 110 (10), 109 (100), 108 (25), 82 (10)	5	-
9 A13 [C]	24,43	178 (5), 110 (10), 109 (100), 108 (20), 94 (5)	4	-

[a] podmínky GC analýzy viz experimentální část [C] nebylo identifikováno



Obr. 16: Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus jonquilla* cv. L. Yazz

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla provedena GC/MS analýza a testování na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám (HuAChE, HuBuChE) 7 různých kultivarů *Narcissus jonquilla* L. z čeledi Amaryllidaceae. Byly vytvořeny alkaloidní extrakty z cibulí těchto rostlin.

Během jednotlivých analýz byla identifikována celá řada alkaloidů produkovaných čeledí Amaryllidaceae z různých strukturních typů. Některé z látek se nepodařilo identifikovat, nebyly nalezeny v knihovnách spekter, ani se je nepodařilo dohledat v dostupné literatuře a standardech. Tyto alkaloidy by měly být pro konečnou identifikaci izolovány v čisté formě a podrobeny další strukturní analýze.

Z provedené studie byla nejvyšší inhibice vůči lidské acetylcholinesteráze naměřena u *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry s hodnotou IC_{50} 6,53 ± 0,88 $\mu g.ml^{-1}$. Specifická biologická aktivita je pravděpodobně zapříčiněna vysokým obsahem (73 % TIC) alkaloidů s již prokázanou inhibiční účinností, především alkaloidu galanthaminu. I ostatní extrakty vykazovaly velmi zajímavou inhibiční aktivitu, která byla s výjimkou vzorku *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundial, vždy s hodnotou IC_{50} vůči HuAChE do 20 $\mu g.ml^{-1}$. Mezi nejvýraznější inhibitory lidské butyrylcholinesterázy v rámci této studie patřil extrakt z *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc s hodnotou IC50 5,09 ± 0,64 $\mu g.ml^{-1}$.

Na základě literárních údajů z posledních let o významu BuChE v pokročilejších stádiích AD je vhodné hledat látky s duální aktivitou. Z hlediska duální aktivity, tzn. biologické aktivity vůči HuAChE i HuBuChE, vychází nejlépe extrakty *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc a *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry, které mají obě hodnoty IC_{50} relativně nízké.

Ze studovaných druhů se pro další fytochemické práce nejlépe hodí extrakty *Narcissus jonquilla* L. cv. Sundisc a *Narcissus jonquilla* L. cv. Waterperry, neboť u těchto rostlin nacházíme významnou inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám a zároveň i určité množství dosud přesně neidentifikovaných látek, které by za tuto aktivitu mohly být odpovědné.

7 SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ABL	Absorbance slepého vzorku
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
AChEI	Inhibitor acetylcholinesterázy
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidový prekurzorový protein
ASA	Absorbance měřeného vzorku
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CNS	Centrální nervová soustava
COX	Cyklooxygenáza
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5’-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EtOAc	Ethylacetát
GC/MS	Plynová chromatografie a hmotnostní spektometrie
GSK-3-β	Glykogensyntházakináza
HLA-DR	Human leukocyte antigen (lidský leukocytární antigen)
IC	Inhibiční koncentrace
IChE	Inhibitor cholinesterázy

LDL	Low-density lipoprotein (nízkodenzitní lipoprotein)
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry (Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie)
NIST MS	Knihovna hmotnostních referenčních spekter
NMDA	*N*-methyl-*D*-aspartát
RT	Retenční čas
TIC	Totální iontový proud
% I	Procenta inhibice

8 LITERATURA

1 Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., AbouDonia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: *Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells*. J. Nat. Prod. *73*, 1223 (2010).

2 Nováček F.: *Fytochemické základy botaniky*, str. 191. Fontána, druhé doplněné vydání, Olomouc 2008.

3 Dalecká M., Havelka R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.*: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění*. Chem. Listy *107*, 701 (2013).

4 Cortesa N., Posada-Duqueb R. A., Alvareza R., Alzatec F.,Berkovd S., Cardona-Gómezb G. P., Osorioa E.: *Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study*. Life Sciences *122*, 42 (2015).

5 Perveen S., Al-Taweel A. M., Fawzy G.AIbrahim., T. A., Malik A., Khan A.: *Cholinesterase Inhibitory Triterpenes from Perovskia atriplicifolia*. Asian J. Chem. *26*, 6163 (2014).

6 Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C. P.: *The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis.* Alzheimer's & Dementia *9*, 63 (2013).

7 Seidl Z., Obenberger J., v knize: *Neurologie pro studium i praxi*, kap. 5. Grada Publishing, první vydání, Praha 2004.

8 Jedlička P., Keller O.: *Speciální neurologie*, str. 220. Galén, 1. vydání, Praha 2005.

9 Novotná M., v knize: *Neurologie pro všeobecné praktické lékaře* (Herle P., ed.), kap. 12. Dr. Josef Raabe, Praha 2012.

10 Fišar Z., v knize: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*, kap. 10. Grada Publishing, druhé vydání, Praha 2009.

11 Beal M. F.: *Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann. Neurol. *56*, 357 (1995).

12 Koukolík F., Jirák R., Ballenger J. F.: *Alzheimerova nemoc a další demence: biological, clinical, and cultural perspectives*. Grada, Praha 1998.

13 Marisa R. (Ed): *Alzheimer's Disease Diagnosis And Treatments*. Nova Science, New York 2011.

14 Jirák R., Obenberger J., Preiss M.: *Alzheimerova choroba a další demence*. Grada Publishing, Praha 1998.

15 Rakonczay Z., Kovacs I.*: Cholinesterases in Alzheimer's disease and cholinesterase inhibitors in Alzheimer therapy*. Acta Biol. (Budapest) *49*, 55 (1998).

16 Vokurka M., Hugo J.: *Velký lékařský slovník*, str. 451. Maxdorf, sedmé vydání, Praha 2007.

17 Chatonnet A., Lockridge O.: *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. Biochem. J. *260*, 625 (1989).

18 Graybiel A. M., Ragsdale C. W.: *Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey*. Nature *299*, 439 (1982).

19 Brimijoin S., Hammond P.: *Butyrylcholinesterase in human brain and acetylcholinesterase in human plasma: trace enzymes measured by two-site immunoassay*. J. Neurochem. *51*, 1227 (1988).

20 Franková V., v knize: *Alzheimerova demence v praxi: konsenzus psychiatricko-neurologicko-geriatrický*, kap. 6. Mladá fronta a.s., Praha 2011.

21 Waberžinek G., Krajíčková D., v knize*: Základy speciální neurologie*, kap. 8. Karolinum, Praha 2006.

22 Bastianetto S., Quirion R.: *EGb 761 is a neuroprotective agent against β-amyloid toxicity.* Cell. Mol. Biol. (Paris, Fr., Print*) 48*, 693 (2002).

23 Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E. X., Zerlin M.: *Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galanthamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease*. Biol. Psychiatry *49*, 279 (2001).

24 Heinrich M., Teoh H. L.: *Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucassian knowledge*. J. Ethnopharmacol. *92*, 147 (2004).

25 SÚKL: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php, staženo 1. 5. 2015.

26 Sramek J. J., Frackiewicz J. E., Cutler R. N.: *Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine*. Expert Opin. Invest. Drugs *9*, 2393 (2000).

27 Fulton B., Benfield P.: *Galanthamine*. Drugs Aging *9*, 60 (1996).

28 Barnes C. A. et al.: *Chronic treatment of old rats with donepezil or galanthamine. Effect on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors*. Neuroscience *99*, 17 (2000).

29 Bickel U., Thomsen T., Fischer J. P.: *Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice*. Neuropharmacology *30*, 447 (1991).

30 Kewitz H.: *Pharmacokinetics and metabolism of galanthamine.* Drugs Today *33*, 265 (1997).

31 Jahodář L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*, str. 181. Karolinum, třetí vydání, Praha 2011.

32 Jin Z.: *Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids*. Nat. Prod. Rep. *30*, 849 (2013).

33 Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martinez V., Codina C., Viladomat F.: *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids*. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences *2*, 65 (2011).

34 Ghoshal S., Saini K. S., Razdan S.*: Chemical constituents of the Amaryllidaceae. Crinum alkaloids: their chemistry and biology*. Phytochemistry *24*, 2141(1985).

35 Jin Z.: *Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids*. Nat. Prod. Rep. *26*, 363 (2009).

36 Nagy M., Grančai D., Mučaji P., v knize: *Farmakognózia – Biogenéza prírodných látok*, kap. 8. Osveta, první vydání, Martin 2011.

37 Samuelsson G., Bohlin L.: *Drugs of Natural Origin*. Apotekarsocieteten, 6. revidované vydání, Kristianstad (Švédsko), 2009.

38 The National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=54852&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock, staženo 1. 5. 2015.

39 Bryan J. E.: *Cibuloviny: kapesní atlas*, str. 149. Knižní klub, první vydání, Praha 2010.

40 van Dijk H., Kurpershoek M.: *Encyklopedie cibulnatých a hlíznatých okrasných rostlin*. Rebo, Čestlice 2002.

41 Pacific Bulb Society: http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/MiniatureNarcissus, staženo 1.5.2015.

42 Dutch Bulbs : http://www.dutchbulbs.co.uk/csp/parkers/products/large/0000198.jpg, staženo 1. 5. 2015.

43 Torras-Claveria L., Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: *Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity.* Ind. Crops Prod. *43*, 237 (2013).

44 López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: *Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts*. Life Sciences *71*, 2521 (2002).

45 Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., Stěpánková Š., Novák Z., Ločárek M., Opletal L., Hrabinová M., Jun D., Benešová N., Kuneš J., Cahlíková L.: *Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some Narcissus species and varieties and their biological activity*. Nat. Prod. Commun. *9*, 1151(2014).

46 Schmeda - Hirschmann G., Rodriguez J. A., Loyola J. I., Astudillo L., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: *Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats*. Pharm. Pharmacol. Commun. *6*, 309 (2000).

47 Li X., Yu H. Y., Wang Z. Y., Zhang P., Ruan H. L.: *Neuroprotective compounds from the bulbs of Lycoris radiata*. Fitoterapia *88*, 82 (2013).

48 Radicheva N., Mileva K., Stoyanova N., Georgieva B.: *Further studies on Nivalin P-induced changes in muscle fiber membrane processes.* Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. *21*, 5 (1999).

49 Eichhorn J., Takada T., Kita Y., Zenk M. H.: *Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine.* Phytochemistry *49,* 1037 (1998).

50 Bastida J., Lavilla R., Viladomat F.: *Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids.* Alkaloids *63*, 87 (2006).

51 Schmeda-Hirschmann G., Astudillo L., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: *DNA binding activity of Amaryllidaceae alkaloids.* Bol. Soc. Chil. Quim. *45*,515 (2000).

52 Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., Touema S. M., Hammoda H. M., Shawky E., Motta A.: *(−)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from Amaryllis belladonna L. growing in Egypt.* Phytochemistry *65*, 2113 (2004).

53 Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S.: *Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus*. Res. Virol. *140*, 115 (1989).

54 Hammoda H. M., Abou-Donia A. H., Toaima S. M. and Shwaky E. A.: *Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae plant extracts and alkaloidal isolates*. Alexandria J. Pharm. Sci. *25*, 26 (2011).

55 Stevens R. V., DuPree L. E. Jr., Loewenstein P. L.: *General methods of alkaloid synthesis. Synthesis of the 5,10b-ethanophenanthridine Amaryllidaceae alkaloids. Stereoselective total synthesis of dl-elwesine (dihydrocrinine).* J. Org. Chem. *37,* 977 (1972).

56 Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: *Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae*. Phytother. Res. *17*,1220 (2003).

57 Kaya G. I., Sarikaya B., Onur M. A., Somer N. U., Viladomat F., Codina C., Bastida J., Lauinger I. L., Kaiser M., Tasdemir D.: *Antiprotozoal alkaloids from Galanthus trojanus*. Phytochem. Lett. *4*, 301 (2011).

58 McNulty J., Nair J. J.,Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C.: *Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids*. Phytochemistry *68*, 1068 (2007).

59 Havelek R., Seifertová M., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L., Dalecká M., Vávrová J., Řezáčová M., Opletal L., Bílková Z.: *The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells.* Phytomedicine *21*, 479 (2014).

60 Furusawa E., Irie H., Combs D., Wildman W. C.: *Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids*. Chemotherapy (Basel, Switz.) *26*, 36 (1980).

61 Hohmann J., Forgo P., Molnár J., Wolfard K., Molnár A., Thalhammer T., Máthé I., Sharples D.: *Antiproliferative amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of Sprekelia formosissima and Hymenocallis x festalis*. Planta Med. *68*, 454 (2002).

62 Tanker M., Çitoglu G., Gümühel B., Hener B.: *Alkaloids of Sternbergia clusiana and their Analgesic Effects.* Int. J. Pharmacogn. *34*, 194 (1996).

63 Antoun M. D., Mendoza N. T., Ríos Y. R., Proctor G. R., Wickramaratne D. B., Pezzuto J. M., Kinghorn A.D.: *Cytotoxicity of Hymenocallis expansa alkaloids*. J. Nat. Prod. *56*, 1423 (1993).

64 Çitoğlu G., Tanker M., Gümüşel B.: *Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine*. Phytother. Res. *12*, 205 (1998).

65 Adesanya S. A., Olugbade T. A., Odebiyi O. O., Aladesanmi J. A.: *Antibacterial Alkaloids in Crinum jagus*. Inter. J. Pharmacog. *4,* 303 (1992).

66 Sarikaya B. B., Kaya I. G., Onur M. A., Bastida J., Somer N. U.: *Phytochemical investigation of Galanthus woronowii.* Biochem. Syst. Ecol. *51*, 276 (2013).

67 Del Giudice L., Massardo D. R., Pontieri P., Wolf K.: *Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: Null alleles of RTG genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rho0 petites of Saccharomyces cerevisiae*. Gene *354*, 9 (2005).

68 Mackey Z. B., Baca A. M., Mallari J. P., Apsel B.,Shelat A., Hansell E. J., Chiang P. K., Wolff B., Guy K. R., Williams J., McKerrow J. H.: *Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of Trypanosoma brucei.* Chem. Biol. Drug Des*. 67*, 355 (2006).

69 Ieven M., Vanden Berghe D. A., Vlietinck A. J.: *Plant antiviral agents. IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses.* Planta Med. *49*, 109 (1983).

70 Hwang Y. C., Chu J. J., Yang P. L., Chen W., Yates M. V.: *Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay*. Antiviral Res. *77*, 232 (2008).

71 Deng L., Dai P., Ciro A., Smee D. F., Djaballah H., Shuman S.: I*dentification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly.* J. Virol. *81*, 13392 (2007).

72 Li Y., Liu J., Tang L. J., Shi Y. W., Ren W., Hu W. X.: *Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest*. Oncol. Rep. *17*, 377 (2007).

73 Giordani R. B., Vieira P.deB., Weizenmann M., Rosemberg D. B., Souza A. P., Bonorino C., de Carli G. A., Bogo M. R., Zuanazzi J. A., Tasca T.: *Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, Trichomonas vaginalis, via an alternative non-apoptotic death pathway*. Phytochemistry *72*, 645 (2011).

74 Citoglu G. S., Acikara O. B., Yilmaz B. S., Ozbek H.: *Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from Sternbergia fisheriana (Herbert) Rupr*. Fitoterapia *83*, 81 (2012).

75 Elgorashi E. E., Stafford G. I., Van Staden J.: *Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids*. Planta Med. *70*, 260 (2004).

76 Iqbal Z., Nasir H., Hiradate S., Fujii Y.: *Plant growth inhibitory activity of Lycoris radiata Herb. and the possible involvement of lycorine as an allelochemical*. Weed Biol. Manage. *6*, 221 (2006).

77 Liu J., Li Y., Tang L. J., Zhang G. P., Hu W. X.: *Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells*. Biomed. Pharmacother. *61*, 229 (2007).

78 Kang J., Zhang Y., Cao X., Fan J., Li G., Wang Q., Diao Y., Zhao Z., Luo L., Yin Z.: *Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge*. Int. Immunopharmacol. *12*, 249 (2012).

79 Hua D. H., Saha S., Takemoto D. J.: *Anticancer activities of 2,5,8,9-substituted 6-oxo-1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthridines on multi-drug-resistant phenotype cells*. Anticancer Res. *17*, 2435 (1997).

80 Kornienko A., Evidente A.: *Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.) *108*, 1982(2008).

81 Wilson R. M., Danishefsky S. J.: *Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents*. Chem. Soc. Rev. *36*, 1207 (2007).

82 Pettit G. R., Pettit G. R. 3rd, Backhaus R. A., Boyd M. R., Meerow A. W.: *Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostyrils from Hymenocallis*. J. Nat. Prod. *56*, 1682 (1993).

83 Griffin C., Hamm C., McNulty J., Pandey S.: *Pancratistatin induces apoptosis in clinical leukemia samples with minimal effect on non-cancerous peripheral blood mononuclear cells.* Cancer Cell Int. *10*, 1 (2010).

84 Weniger B., Italiano L., Beck P., Bastida J., Bergoñón S., Codina C., Lobstein A., Anton R.: *Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids*. Planta Med. *61*, 77 (1995).

85 Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Feather-Stone R. M.: *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. (Amsterdam, Neth.) *7*, 88 (1961).

86 Doepke W., Dalmer H.: *Amaryllidaceae alkaloids*. Naturwissenschaften *52*, 60 (1965).

87 Boit H. G., Stender W., Beitner A.: Amaryllidaceous alkaloids. XVII. *The alkaloids of several garden varieties of Narcissus jonquilla, N. triandrus, and N. cyclamineus*. Chemische Berichte *90*, 725 (1957).

88 Masi M., Cimmino A., Frolova L. V., Rogelj S., Yu X., Pertsemlidis A., Mathieu V., De Carvalho A., Kiss R., Kornienko A.: *Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from Narcissus jonquilla quail, with activity against drug-resistant cancer*. Fitoterapia *102C*, 41 (2015).

89 Cahlíková L., Benešová N., Macáková, K. Urbanová K., Opletal L.: *GC/MS analysis of three amaryllidaceae species and their cholinesterase activity*. Nat. Prod. Commun. *6*, 1255 (2011).

90 Cahlíková L., Zavadil S., Macáková K., Valterová I., Kulhánková A., Hošťálková A., Kuneš J., Opletal L.: *Isolation and Cholinesterase Activity of Amarylidaceae Alkaloids from Nerine bowdenii*. Nat. Prod. Commun. *6*, 1827 (2011).