

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

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

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

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

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

Hradec Králové, 2016 Vacková Lucie

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

V Hradci Králové, 2016

.....

Podpis

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Jakubu Chlebkovi, PhD. za odborné rady, trpělivost, ochotu a velmi vstřícný přístup a za provedení GC-MS analýzy izolovaných látek. Děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Csc. za měření NMR spekter a prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za měření cholinesterasové inhibiční aktivity izolovaných látek. Další poděkování patří všem pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za rady a příjemné pracovní prostředí.

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>5</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>7</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA .....	10
3.1.1 <i>Epidemiologie.....</i>	<i>10</i>
3.1.2 <i>Klinický obraz .....</i>	<i>10</i>
3.1.3 <i>Rizikové faktory.....</i>	<i>11</i>
3.1.4 <i>Diagnostika .....</i>	<i>11</i>
3.1.5 <i>Patofyziologie.....</i>	<i>12</i>
3.1.6 <i>Terapie .....</i>	<i>16</i>
3.2 NARCISSUS 'DUTCH MASTER' .....	23
3.2.1 <i>Taxonomické zařazení.....</i>	<i>23</i>
3.2.2 <i>Charakteristika čeledi Amaryllidaceae.....</i>	<i>23</i>
3.2.3 <i>Charakteristika rodu Narcissus L.....</i>	<i>23</i>
3.2.4 <i>Morfologický popis Narcissus 'Dutch Master'.....</i>	<i>24</i>
3.2.5 <i>Obsahové látky čeledi Amaryllidaceae a rodu Narcissus L. ....</i>	<i>24</i>
3.2.6 <i>Obsahové látky rodu Narcissus L. a Narcissus 'Dutch Master' .....</i>	<i>24</i>
3.2.7 <i>Aktivita inhibice AChE testovaných alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae .....</i>	<i>33</i>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
4.1 MATERIÁL A VYBAVENÍ.....	34
4.1.1 <i>Rozpouštědla a chemikálie.....</i>	<i>34</i>
4.1.2 <i>Pomocné látky.....</i>	<i>34</i>
4.1.3 <i>Detekční činidla .....</i>	<i>34</i>
4.1.4 <i>Chromatografické absorbenty .....</i>	<i>35</i>
4.1.5 <i>Přístrojové vybavení.....</i>	<i>35</i>
4.2 OBECNÝ POSTUP PRÁCE.....	36
4.2.1 <i>Příprava a čištění rozpouštědel.....</i>	<i>36</i>
4.2.2 <i>Odpařování extraktů a frakcí .....</i>	<i>36</i>
4.2.3 <i>Sušení a skladování frakcí a vyizolovaných čistých látek.....</i>	<i>36</i>
4.2.4 <i>Chromatografie.....</i>	<i>36</i>
4.2.5 <i>Strukturní analýza .....</i>	<i>37</i>

4.3	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH AKTIVIT ALKALOIDŮ A ALKALOIDNÍCH EXTRAKTŮ.....	38
4.3.1	Chemikálie.....	38
4.3.2	Materiál.....	39
4.3.3	Přístroje.....	39
4.3.4	Podmínky měření.....	39
4.3.5	Příprava erytrocytární AChE a BChE z plazmy.....	39
4.3.6	Stanovení inhibiční cholinesterasové aktivity (hodnoty $IC_{50}$ ).....	40
4.4	IZOLACE ALKALOIDŮ.....	41
4.4.1	Rostlinný materiál.....	41
4.4.2	Extrakce drogy a zpracování extraktu.....	41
4.4.3	Sloupcová chromatografie.....	41
4.4.4	Separace a čištění alkaloidů z frakce ND6 (3,214 g).....	43
4.4.5	Separace a čištění alkaloidů z frakce ND6/2 (450 mg).....	44
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>46</b>
5.1	STRUKTURNÍ ANALÝZA LV-1 (O-ACETYLPLUVIIN).....	46
5.1.1	NMR.....	47
5.1.2	GC-MS.....	49
5.1.3	Optická otáčivost.....	49
5.2	CHOLINESTERASOVÁ INHIBIČNÍ AKTIVITA.....	50
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRAKT.....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>55</b>

## Seznam použitých zkratek

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
AMPA	$\alpha$ -amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BACE 1	$\beta$ -sekretasa 1
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BFCN	basal forebrain cholinergic neurons
BChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EtOH	ethanol
GSK3	glykogensynthasa kinasa 3
HupA	huperzin A
IC	inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
NFTs	neurofibrilární shluky
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léky
NT-3	neurotrofin-3
Rf	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie

TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
Trk	tropomyosin receptor kinase
UV	ultrafialová oblast

## Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Narcissus</i> 'Dutch Master' .....	23
Obrázek 2: Syntéza hlavních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae .....	25
Obrázek 3: Syntéza hlavních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (pokračování) .....	26
Obrázek 4: lykorin .....	28
Obrázek 5: galanthin .....	28
Obrázek 6: karanin .....	28
Obrázek 7: homolykorin .....	29
Obrázek 8: lykorenin .....	29
Obrázek 9: haemanthamin .....	30
Obrázek 10: krinin .....	30
Obrázek 11: tazettin .....	31
Obrázek 12: pretazzettin .....	31
Obrázek 13: narciklasin .....	32
Obrázek 14: pankratistatin .....	32
Obrázek 15: galanthamin .....	33
Obrázek 16: Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku .....	43
Obrázek 17: GC chromatogram frakce ND6 .....	44
Obrázek 18: <i>O</i> -acetylpluviin .....	46
Obrázek 19: <sup>1</sup> H NMR spektrum <i>O</i> -acetylpluviinu .....	47
Obrázek 20: <sup>13</sup> C NMR spektrum <i>O</i> -acetylpluviinu .....	48
Obrázek 21: GC chromatogram <i>O</i> -acetylpluviinu .....	49
Obrázek 22: MS-EI spektrum <i>O</i> -acetylpluviinu .....	49

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Výsledky sloupcové chromatografie .....	42
Tabulka 2: Podfrakce ND6 .....	44
Tabulka 3: Cholinesterasová inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu LV-1 ( <i>O</i> -acetylpluviin). .....	50



## 1 Úvod

Dnešní vyspělá medicína přispívá k prodloužení průměrné délky života, to má za následek zvýšení počtu obyvatel ve věku vyšším než 65 let. Podle statistik se pohybuje počet seniorů v České republice od 16,7 % do 19 % na celkový počet obyvatel a tato čísla se každým rokem zvyšují. [1]

S prodlužující se délkou života úzce souvisí nejrůznější nemoci a to nejvíce kardiovaskulární, nervové a nádorové. Zejména nemoci nervového systému jsou stále více zkoumány a to hlavně proto, že velké množství funkčních poruch má kořeny v neurologickém deficitu, který zahrnuje poruchy kognitivních funkcí. [2]

Poruchami kognice jsou ve většině případů myšleny poruchy paměti, i když tento pojem zahrnuje řadu dalších funkcí. Kognitivní poruchy můžeme rozdělit do tří skupin na benigní stařeckou zapomnětlivost, na mírnou kognitivní poruchu a demenci. [3]

Současná věda se stále více zabývá různými formami demence, podle odhadů 150 tisíc obyvatel České republiky trpí touto nemocí. Demence se dělí na dvě skupiny - na cévně podmíněné a neurodegenerativní demence, mezi které řadíme Alzheimerovu chorobu (AD). Právě AD má nejvyšší zastoupení v populaci (až 70 %). V dnešní době stále neexistuje kauzální léčba nemoci, využívá se pouze léčba symptomatická. [4]

Léčba AD zahrnuje dvě základní skupiny léků a to inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) a blokátory NMDA receptorů. Několik klinických studií probíhá v souvislosti s využitím antiamyloidově působících látek. Kromě kognitivních poruch je u pacientů trpících AD výhodné použití léčiv ovlivňujících nekognitivní funkce, jako jsou antidepresiva a antipsychotika. [4]

Vhodným zdrojem léčiv používaným při terapii AD se ukázaly rostlinné extrakty. Velmi důležitou a dosud využívanou přírodní látkou je galanthamin, který funguje jako inhibitor AChE. Katedra farmaceutické botaniky a ekologie se zabývá studiem biologické aktivity obsahových látek rostlin. V několika grantech se zaměřila na studium rostlinných inhibitorů AChE a butyrylcholinesterasy (BChE). Moje diplomová práce se zabývá izolací látek z *Narcissus* 'Dutch Master' čeledi Amaryllidaceae a studuje jejich strukturu a inhibiční účinek vůči AChE a BChE.

## 2 Cíl diplomové práce

Cíle diplomové práce:

1. izolace alkaloidů z vybrané frakce získané ze sloupcové chromatografie sumárního alkaloidního výtřepku z *N.* 'Dutch Master';
2. získání alespoň jednoho čistého alkaloidu izolovaného z alkaloidního výtřepku z *N.* 'Dutch Master';
3. podíl na určení struktury alkaloidů pomocí spektrálních metod a určení jejich fyzikálně-chemických vlastností;
4. podíl na určení biologické aktivity čistých izolovaných alkaloidů.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je jednou z nejčastějších forem demence. Byla objevena Aloisem Alzheimerem na začátku 20. století. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění zasahující hippokampus a temporoparietální lalok. Postihuje zejména starší populaci, téměř polovina postižených je ve věku vyšším než 80 let. Člověk trpící touto chorobou nejprve ztrácí paměť krátkodobou, nakonec ztratí ponětí o sobě samém. [5], [6]

#### 3.1.1 Epidemiologie

Výskyt AD úzce souvisí s věkem pacienta. Nejčastěji se nemoc objevuje po 65 roce věku a s ním roste i počet postižených. Odhaduje se, že 5,4 % obyvatel trpí demencí, z toho největší část zaujímá právě AD. [7], [8]

AD můžeme rozdělit na dvě fáze. První takzvaná presenilní časná fáze se u pacienta objeví už před 65. rokem, většinou má genetickou predispozici. Její průběh je rychlejší a agresivnější než fáze senilní pozdní, která se nejčastěji objevuje až ve stáří tedy po 65 roce věku. [7], [8]

#### 3.1.2 Klinický obraz

AD se rozvíjí velmi pomalu, z počátku se projevuje drobnými ztrátami paměti, které se v průběhu nemoci prohlubují. Nejprve si nemocný nedokáže zapamatovat nové věci, postupně dochází ke ztrátě vzpomínek, dezorientaci i ve známém prostředí. Pacienti velmi rychle zapomínají na nemoc, nejsou schopni si ji uvědomit, s progresí nemoci ztrácí soběstačnost. Pacienti dále trpí změnami nálad a chování, halucinacemi, změnami osobnosti a zvýšenými projevy agresivity. Symptomy se postupně stupňují, pacienti ztrácí slovní zásobu, schopnost rozpoznat rodinu a známé. Nemocní nedokážou číst ani psát, stávají se negramotnými. V poslední fázi AD není vzácný ani výskyt extrapyramidových příznaků hypertonicko-hypokinetického typu. AD je neléčitelná nemoc končící smrtí nemocného, která nastává v rozmezí 5-12 let od propuknutí nemoci. [6], [8]

### 3.1.3 Rizikové faktory

Genetika je u presenilní formy AD jedním z hlavních rizikových faktorů nemoci. Onemocnění bývá podmíněno výskytem mutace na 21. chromosomu, kde je kódován amyloidový prekurzorový protein (APP). [8]

Mutace se mohou vyskytovat i na 14. a 1. chromosomu, které kódují transmembránové proteiny preseniliny. Mutace u presenilinů mohou ovlivnit  $\gamma$ -sekretasu, která je zodpovědná za tvorbu  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ). [8]

Nejenom presenilní forma AD je ovlivněna geneticky, ale i forma senilní. Mutace 12. chromosomu, kódujícího  $\alpha_2$ -makroglobulin, může zvýšit tvorbu  $A\beta$ . Dalším rizikem je výskyt izoformy E4 apolipoproteinu E. Tento genetický polymorfismus ale není podmínkou propuknutí AD. Do rizikových faktorů se řadí genetický polymorfismus v kódování butyrylcholinestetry a interleukinu 1. [8]

Mezi další rizikové faktory patří vysoký krevní tlak, nadváha, zranění způsobující poškození mozku a v neposlední řadě diabetes mellitus 2. typu, který riziko výskytu AD může až zdvojnásobit. [9]

Naopak zdravá strava, dostatečná pohybová aktivita a vyšší duševní aktivita působí protektivně. [9]

### 3.1.4 Diagnostika

Diagnostika AD je jedním z nejhlavnějších kroků léčby, rozhoduje o kvalitě života postižených, protože když je nemoc včas rozpoznána, může být zbrzděn její rozvoj. [10] Základním zkušebním testem časných stádií AD je Mini-Mental Examination test (MMSE). V tomto testu jsou testovány dvě skupiny, jednu tvoří zdraví jedinci a druhou pacienti. Tyto skupiny dostávají úkoly na orientaci a paměť. [7]

Jedním z dalších testů je analýza likvoru, kde je snížené množství  $\beta$ -amyloidu 42 ( $A\beta_{42}$ ) a naopak zvýšené množství  $\tau$ -proteinu a fosforylovaného  $\tau$ -proteinu. [7]

Velmi využívanou neinvazivní diagnostickou metodou je molekulární diagnóza založená na přítomnosti nebo nepřítomnosti různých biomarkerů v tkáních. Tyto molekulární substance mohou být snímány pomocí pozitronové emisní tomografie (PET), magnetické rezonance (MRI) a jaderné magnetické rezonanční spektroskopie (NMRS). [10]

### 3.1.5 Patofyziologie

AD je velmi často označována jako neurodegenerativní choroba, která ovlivňuje zejména cholinergní systém. Dochází ke kortiko-subkortikální atrofii mozku. Ta se nejčastěji objevuje v oblasti hippocampu, dochází ke ztenčení gyrů a k rozšíření temporálních rohů postraních komor. [8]

V mozku jsou patrné senilní plaky tvořené extracelulárními ložisky  $A\beta$  a neurofibrilárními shluky (tangles-NFTs) složenými z intracelulárního hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu. Následuje porucha funkce neuronů a jejich následná ztráta. [11]

Tyto změny v mozku, vedou k tvorbě zánětu, který poškozuje synaptickou funkci. Dochází ke zhoršení cholinergní transmise v důsledku ztráty  $\alpha 4\beta 2$  nikotinových acetylcholinových receptorů. Počet  $5HT_1$  serotoninových receptorů se snižuje, naopak  $5HT_4$  serotoninových receptorů zvyšuje. [12]

#### 3.1.5.1 Cholinergní hypotéza

Jednou z prvních příčin AD byl objeven deficit v cholinergní neurotransmisi.[20] Acetylcholin (ACh) je neurotransmitter tvořící se v nervových zakončeních z cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) pomocí cholinacetyltransferasy. ACh se váže na muskarinové a nikotinové receptory, které ovlivňují kognitivní funkce. Takto vázaný neurotransmitter je hydrolyzován acetylcholinesterasou na cholin a acetát. [21]

U pacientů trpících AD je snižena aktivita cholinacetyltransferasy, tvorba acetylcholinu, jeho zpětné vychytávání a uvolňování. Dochází k degeneraci cholinergních neuronů a k poruše cholinergní neurotransmise v mozkové kůře a ostatních částech mozku, které ovlivňují jeho kognitivní funkce. [22]

V mozku pacientů bylo objeveno, že množství subtypu  $\alpha$ -4 nikotinových receptorů je sníženo, dále je snižován počet růstových faktorů a jejich receptorů. Tento fakt úzce souvisí se správnou funkcí tohoto systému. [23]

### 3.1.5.2 *$\beta$ -Amyloid a vznik plaků*

A $\beta$  je peptid, který je tvořen transmembránovým amyloidovým prekurzorovým proteinem (APP). [14] APP je přítomen v mnoha různých buňkách - i v neuronech a gliích, který je štěpen  $\alpha$ - ,  $\beta$ - a  $\gamma$ - sekretasou na kratší peptidy. [15]

Za fyziologických okolností  $\alpha$ -sekretasa a následně  $\gamma$ -sekretasa štěpí APP tzv. neamyloidní cestou. Touto cestou vzniká rozpustný sAPP $\alpha$  fragment, který je zodpovědný za správnou funkci neuronů. Chrání je před oxidativním stresem, podporuje učení a paměť. Naopak u pacientů postižených AD je APP rozkládán zejména  $\beta$ - a  $\gamma$ - sekretasou, ta je zodpovědná za vznik A $\beta$ (1-40) nebo A $\beta$ (1-42) peptidů. [15]

Vlivem nerovnováhy mezi tvorbou a odstraňováním těchto peptidů dochází k jejich ukládání v CNS, kde se nachází dva druhy A $\beta$  plaků: neuritické a difuzní plaky. Vývoj plaků začíná tvorbou difuzních plaků, které vyzárají do plaků neuritických. Tyto nerozpustné peptidy se dále spojují do A $\beta$  oligomerů, polymerizují do fibril, které jsou součástí plaků. [19]

### 3.1.5.3 *Excitace NMDA receptorů*

A $\beta$  oligomery jsou podle studií příčinou deregulace excitační synaptické transmise, kvůli nadměrné excitaci AMPA receptorů a NMDA glutamátových receptorů v mozku, které jsou podstatné pro paměť a učení. Hlavním excitačním neurotransmiterem je glutamát uvolňován z presynaptické membrány, který se váže na ionotropní AMPA receptor a nastává depolarizace postsynaptické membrány. Dochází k aktivaci NMDA receptorů, otevření kalciových kanálů a influxu kalcia do buněk. [45], [46]

U AD dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu a poruše jeho zpětného vychytávání. Zvýšené množství tohoto transmiteru stupňuje aktivitu NMDA receptorů, která vede k zvýšenému vstupu kalcia do buněk. Tento mechanismus způsobí nadměrnou aktivitu kalcium dependentních enzymů ovlivňující tvorbu kyslíkových a dusíkových radikálů končící smrtí buňky. [41], [47]

#### **3.1.5.4 Neurofibrilární klubka**

NFTs vznikají degenerací bílkoviny zvané  $\tau$ -protein, který je u zdravého člověka vázán v mikrotubulech nervových buněk. U pacientů trpících AD dochází k jeho uvolnění a následnému párování do spirálních vláken, která jsou základem pro tvorbu NFTs. Neurony, které jsou takto změněny, zanikají. Při testování mozkomíšního moku pacientů s AD se objevují vysoké hodnoty právě  $\tau$ -proteinu. [13]

#### **3.1.5.5 Apolipoprotein E**

Apolipoprotein E (ApoE) je protein, jehož hlavní funkce spočívá v metabolismu lipidů, může se ale účastnit vzniku neurodegenerativních chorob. ApoE se podílí na transportu lipidů do buněk různých orgánů a tkání díky vazbě na lipoproteinové receptory a lipidové komplexy, vyskytuje se v několika isoformách: ApoE2, ApoE3 a ApoE4. [24]

Tento protein se tvoří v různých tkáních a buňkách těla a to i v CNS, kde jsou jeho hlavními producenty astrocyty. V mozku je tvořeno velké množství lipidů, které jsou pomocí ApoE transportovány a rovněž, ApoE napomáhá obnově axonů a Schwanových buněk. Protein ApoE má nejen fyziologickou funkci, ale má i účast na patologických procesech. [24]

Osoby, které mají alelu ApoE4 mají větší pravděpodobnost výskytu AD. Je to pouze rizikový faktor, není podmínkou výskytu onemocnění. ApoE4 spolu s  $A\beta$  se ukládají do amyloidních plaků a podporují jejich tvorbu. [25]

#### **3.1.5.6 Růstové faktory**

Počet nervových růstových faktorů (NGF) je u pacientů trpících AD snížen. NGF je zodpovědný za tvorbu nervových buněk, za jejich přežití a spojování, dále se stará o utváření paměti a poznávání. [26]

NGF patří do rodiny neurotrofinů, které jsou rodinou trofických faktorů v nervovém systému a jejich úkolem je přenášet signál mezi určitou tkání a neuronem. NGF je protein, který je syntetizován ve formě prekurzoru pro-NGF. Funkce NGF závisí na typu receptoru, na který se váže. Přežití buněk je stimulováno díky vazbě na receptor TrkA, naopak apoptóza buněk díky receptorům p75NTR a sortilinu. Porucha NGF a jejich receptorů vede k neurodegeneraci BFCN, které jsou jimi tvořeny. [27]

### 3.1.5.7 Zánět

Neuronální podklad AD je pouze jednou z příčin, značnou roli v patogenezi hraje i imunitní systém mozku. Senilní plaky a neuronální klubka aktivují imunitu a dochází k odpovědi ve formě zvýšené aktivity mikroglíí, které jsou příčinou zánětu. [33]

Mikroglie jsou buňky, které se aktivují do podoby makrofágů. Tyto buňky se účastní fagocytózy, produkují cytokiny, chemokiny, oxid dusnatý, reaktivní formy kyslíku, složky komplementu a eikosanoidy. [33]

Předpokladem vzniku zánětu je přítomnost senilních plaků a neurofibrilárních klubek, které vedou ke zvýšené tvorbě a aktivitě mikroglíí. [33] Tyto buňky spustí produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF $\alpha$ , interleukin 6, interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6 a C-reaktivní protein (CRP). Jmenované cytokiny a CRP vedou ke zvýšené tvorbě A $\beta$ 42, hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu a prozánětlivých molekul. Celý tento proces vede k neurodegeneraci. [28] NSAID jsou podle studií účinnou formou léčby v počátečních stádiích nemoci, pomáhají blokovat počátky zánětu vedoucí k propuknutí demence. Randomizované studie, ale tyto závěry nepotvrdily. [29]

### 3.1.5.8 Oxidační stres

Další z příčin vzniku a rozvoje AD je oxidační stres. Ten je charakterizován poruchou redoxního systému těla, s kterým souvisí nadbytečná tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a porucha funkce antioxidantního systému. [30]

ROS jsou důležité pro normální funkci buněk, ale při jejich nadbytku může dojít k vážnému poškození organismu. Volné radikály mohou vyvolat řadu reakcí, které ničí lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. [31]

Jedním z nejvíce citlivých orgánů na oxidační stres je mozek a to zejména kvůli velké spotřebě energie a kyslíku, přítomnosti velkého množství snadno oxidovatelných polynenasycených mastných kyselin a kvůli malému množství antioxidantů. Hlavním zdrojem ROS jsou funkčně poškozené mitochondrie. Mitochondrie jsou producenty superoxidového aniontu a i přes přítomnost antioxidantního systému vyprodukují až 90 % volných radikálů. Funkčně poškozené mitochondrie vyprodukují více volných radikálů než ATP a mají velký podíl na patogenezi AD. [32]



### 3.1.6 Terapie

Příčina AD není dosud plně objasněna, proto léčba není kauzální a pouze se snaží ovlivnit probíhající patologické procesy. [17]

Léčba pacientů trpících AD vyžaduje komplexní přístup k nemocnému spojující v sobě léčbu farmakologickou, psychoterapeutickou a rehabilitační. [13]

#### 3.1.6.1 Farmakologická léčba

Farmakologickou léčbu AD můžeme rozdělit na dvě skupiny a to na léčbu kognitivních a nekognitivních poruch.

Kognitivní poruchy jsou léčeny dvěma hlavními typy léčiv [13]:

**-inhibitory cholinesterasy:** ty jsou považovány za základ léčby v lehké a střední fázi onemocnění, patří mezi ně například:

- donepezil
- rivastigmin
- galanthamin

**-blokátory tzv. NMDA receptorů:** využívány hlavně ve středně těžké a těžké fázi nemoci:

- memantin

Ve výzkumu je velké množství dalších léčiv ovlivňujících kognitivní funkce, tyto látky nemají v praxi prozatím velké uplatnění.

Nekognitivní poruchy mezi, které patří poruchy chování a vědomí, mohou být ovlivňovány pomocí antidepresiv typu SSRI a antipsychotik jako je tiaprid, melperon, quetiapin. V léčbě nemoci se využívá extraktů z rostliny *Gingko biloba* L., nootropik nebo zejména u žen je možné využití hormonální léčby. [43]

##### 3.1.6.1.1 Inhibitory AChE a BChE

Hlavním úkolem inhibitorů cholinesteras je blokovat enzymy cholinesterasu a butyrylcholinesterasu (BChE), které rozkládají acetylcholin v synapsích. Tímto způsobem je zvyšováno jeho množství schopné vázat se na muskarinové a nikotinové receptory a zlepšují se tím kognitivní funkce a ovlivňují neuropsychické symptomy. [33]

Jako první byl objeven takrin, který se dnes už nevyužívá, díky jeho hepatotoxickým účinkům. Mezi hlavní používané zástupce patří galanthamin, rivastigmin a donepezil. Tyto sloučeniny se využívají v lehké až středně těžké fázi AD. Podle studií je nutné léčivo užívat nejméně 6 měsíců, aby bylo znatelné zlepšení kognitivním funkcí pacienta. [16], [51]

#### *3.1.6.1.1.1 Donepezil*

Piperidinový derivát donepezil je selektivní nekompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy (AChE), butyrylcholinesterasu téměř neovlivňuje. Tento lék je metabolizován játry pomocí enzymů CYP2D6 a CYP3A4 s terapeutickým poločasem 70 hodin. Počáteční dávka léku je 5 mg denně, která se po několika týdnech zvyšuje na 10 mg denně. Donepezil má dlouhý poločas odbourávání, proto je podáván jen jednou denně. Pacienti tento lék většinou dobře snášejí, i když se mohou vyskytnout některé nežádoucí účinky, jako je nauzea, zvracení, průjem, svalové křeče a nespavost. [33], [34]

#### *3.1.6.1.1.2 Galanthamin*

Terciární fenanthrenový alkaloid galanthamin je obsažen v rostlinách čeledi Amaryllidaceae, z nichž je možné ho izolovat, ale kvůli vysokým nákladům na tento proces je vyráběn i syntézou. [35], [36]

Galanthamin inhibuje AChE a BChE, dále pozitivně moduluje nikotinové receptory. Metabolizace probíhá pomocí enzymů CYP2D6 a CYP3A4, poločas eliminace je kratší jen 5 až 7 hodin, proto se podává ve dvou denních dávkách, popřípadě v jedné denní dávce při použití retardované formy léčiva. Dávka galanthaminu se pohybuje v rozmezí 8 až 32 mg/den. [34],[36] Galanthamin je léčivo s významným neuroprotektivním a protizánětlivým účinkem využívané v terapii lehčích až středně těžkých forem demence u Alzheimerovy choroby. Efektivně ovlivňuje kognitivní funkce, příznivý účinek má na behaviorální i psychologické příznaky nemoci. [18] Vedlejší účinky léku jsou téměř shodné s donepezilem a rivastigminem. [35]

#### *3.1.6.1.1.3 Rivastigmin*

Rivastigmin je látka karbamátového typu, která pseudo-irreverzibilně blokuje AChE i BChE. To znamená, že jeho účinek je delší než jeho přítomnost v plazmě, protože je

odbouráván cholinesterasami. Podává se ve dvou denních dávkách perorálně nebo pomocí transdermálních náplastí, které jsou výhodné pro pacienty, kteří jsou náchylní na gastrointestinální potíže způsobené perorální formou léku. Metabolismus probíhá pomocí cytochromu P450. [37]

#### 3.1.6.1.1.4 *Huperzin A*

Alkaloid Huperzin A (HupA) izolovaný z rostliny *Huperzia serrata* Thunb. byl po dlouhá léta využíván k léčbě schizofrenie, pohmožděnin, otoků a zánětů. HupA působí jako silný kompetitivní inhibitor AChE a má lepší prostupnost přes hematoencefalickou bariéru než galanthamin a tím vyšší biologickou dostupnost v mozku. [38]

Hlavním účelem použití HupA je v terapii AD, zlepšuje paměť, HupA má mnohé další funkce jako je inhibice NMDA receptorů v mozku, působí neuroprotektivně, proti oxidačnímu stresu, křečím a snižuje bolestivé podmínky. [39]

Jeho biologický poločas je 12 hodin a je vylučován močí, metabolismus je ovlivňován cytochromem P450 1A2 a 3A1/2. [40]

Účinnost HupA byla potvrzena několika studiemi. Zlepšení kognitivních funkcí bylo prokázáno v druhé fázi klinického vývoje, kdy bylo pacientům podáváno 400 µg dvakrát denně. Další studie byly zaměřeny na kombinace HupA s memantinem, které prokázaly výhodnější účinky než monoterapie. [38]

#### 3.1.6.1.2 Inhibitory NMDA receptorů

Jediným využívaným inhibitorem NMDA receptorů je adamantanový derivát memantin. Jedná se o nekompetitivní blokátor NMDA receptorů po orálním podání se velmi dobře střebává a jeho biologický poločas je 60 – 80 hodin. Téměř polovina léčiva se metabolizuje v ledvinách v nezměněné formě, zbytek je glukuronidován a vylučuje se močí. [42]

Prvotní dávky léku začínají na 5 mg a zvyšují se do maximální denní dávky na 20 mg. Podle současných doporučení je vhodný pro léčbu středně těžkého až těžkého stádia nemoci, kdy zlepšuje paměť a mluvení. [44]

Jeho funkce spočívá v blokádě NMDA receptorových kanálů a ochraně před excitotoxicitou způsobenou glutamátem interakcí s  $Mg^{2+}$  ionty. [48]

### 3.1.6.2 Další farmakologická léčba

Existuje mnoho dalších léčiv využívaných u pacientů s AD, tyto léky však nemají zcela prokázanou účinnost a většinou jsou využívána jako podpůrná léčba. [51]

#### 3.1.6.2.1 Testosteron

Několik studií prokázalo účinnost testosteronu u mužů s mírnou až středně těžkou formou AD, kterým se snižuje hladina tohoto hormonu. Testosteron zlepšuje prostorovou orientaci a zlepšuje kvalitu života, díky svým nežádoucím účinkům na kardiovaskulární systém se jeho použití nedoporučuje. [51]

#### 3.1.6.2.2 Extrakt z *Ginkgo biloba* L.

Standardizovaný extrakt EGb761 z listů rostliny *Ginkgo biloba* L. je podle preklinických testů účinný v prevenci i léčbě neurodegenerativních chorob, zejména AD. Hlavní farmakologické účinky vykazují flavonoidy a terpenoidy působící jako antioxidanty, chrání mitochondriální funkce a buňky před apoptózou, brání amyloidogenezi a agregaci A $\beta$ , mají protizánětlivé účinky. V rámci klinických testů tyto vlastnosti nebyly doposud prokázány. [53]

#### 3.1.6.2.3 Antioxidanty

Oxidační stres je jedním z hlavních činitelů vedoucím k AD, proto je doporučováno užívat nízké dávky antioxidantů ničících produkty tohoto procesu. Mnoho studií prokázalo přínosný antioxidační účinek vitamínu E v dávce 2000 IU/den. Dále je výhodné užívat jako prevenci rozvoje AD kombinace vitamínu E a C, koenzym Q10, glutationu a melatoninu. [52]

#### 3.1.6.2.4 Nootropika

Nootropika jsou skupinou léčiv využívaných k léčbě nemocí CNS jako jsou: neurodegenerativní nemoci, poruchy myšlení a paměti, ischemie mozku a poškození mozku traumatem. [54]

Tato léčiva zlepšují mozkové funkce, podporují metabolické procesy v mozku, působí na schopnost učení a koncentrace. Jedním ze zástupců je piracetam, který zvyšuje

dostupnost kyslíku v mozku a zlepšuje jeho metabolismus. [54] Dalšími zástupci jsou pyritinol, acetylkarnitin a idebenon. [55]

#### 3.1.6.2.5 Látka ovlivňující nervové růstové faktory

Cerebrolysin je látka tvořená z volných aminokyselin a nízkomolekulárních peptidů, jako celek se jedná o neuropeptid s vlastnostmi růstových faktorů. Tato látka podporuje kognitivní funkce a tvorbu růstových faktorů u pacientů se středně těžkou formou AD. Studie však neprokázaly významnou účinnost. [56], [57]

### 3.1.6.3 *Nové přístupy v potenciální léčbě AD*

#### 3.1.6.3.1 Inhibitory $\beta$ -sekretasy

$\beta$ -Sekretasa je jednou z příčin patologického procesu tvorby a ukládání  $A\beta$ , jejím úkolem je štěpit extracelulární APP.  $\beta$ -Sekretasa existuje ve dvou homolozích– BACE1 a BACE2, právě BACE1 je považována za hlavní příčinu vzniku patologické tvorby a ukládání  $A\beta$ . Inhibice BACE1 se ukázala vhodnou alternativou léčby AD, několik látek v současné době prochází klinickými testy. [58], [59]

#### 3.1.6.3.2 Inhibitory $\gamma$ -sekretasy

Stejně jako BACE1 tak i  $\gamma$ -sekretasa ovlivňuje tvorbu  $A\beta$ , proto se slibnou alternativou léčby AD zdá inhibice právě  $\gamma$ -sekretasy.  $\gamma$ -Sekretasa neovlivňuje pouze APP, ale má podíl na štěpení proteinového Notch receptoru. Ten zasahuje do procesu proliferace, modulace a diferenciaci buněk. Neselektivní inhibice enzymu  $\gamma$ -sekretasy vedla k blokadě Notch receptoru, které vedly k nežádoucím účinkům. A proto se začaly hledat vhodné selektivní blokátory enzymu nazývané jako modulátory. [58]

Semagacestat je látka účinkující jako neselektivní inhibitor  $\gamma$ -sekretasy, který snižuje hladinu  $A\beta$  v plasmě a CSF. V klinických studiích byla prokázána dobrá tolerance látky s výskytem gastrointestinálních a kožních nežádoucích účinků. V průběhu užívání tohoto léku bylo objeveno zhoršování kognitivních funkcí, které souvisí se dvěma skutečnostmi jako je zvyšování hladiny  $\gamma$ -sekretasy díky rebound efektu a neselektivní inhibici tohoto enzymu. [58]

Tarenflurbil patří do skupiny NSAIDs, jedná se o *R*-enantiomer flurbiprofenu označovaný jako první selektivní modulátor  $\gamma$ -sekretasy. Jeho účinek spočívá ve schopnosti zkracovat A $\beta$ 42 na kratší peptidy, které nemají takovou schopnost tvořit plaky. Několik studií prokázalo zlepšení denních aktivit a fungování pacienta celkově, změna kognitivních funkcí nebyla prokázána. [58]

#### 3.1.6.3.3 Stimulátory $\alpha$ -sekretasy

Proteolytický enzym  $\alpha$ -sekretasa štěpí APP, a tím zabraňuje ukládání A $\beta$ . Tato skutečnost vedla k rozvoji dalšího způsobu léčby AD—k vývoji látek stimulujících enzym  $\alpha$ -sektetasu. GABA<sub>A</sub> selektivní modulátor a stimulátor  $\alpha$ -sekretasy etazolát je jednou z testovaných látek. [60]

#### 3.1.6.3.4 Blokáda agregace A $\beta$

Další zkoumanou alternativou léčby AD je inhibice agregace A $\beta$ , protože právě tento děj je jedním z hlavních patologických změn vyskytujících se v mozku pacientů. Mezi testované látky patří tramiprosat, který se váže na monomer A $\beta$  a brání jeho oligomerizaci a následné agregaci. Studie této látky prokázaly vliv na zlepšení paměti, řeči a praktických dovedností. [58], [60]

Několik studií prokázalo, že peptid kolostrinin dokáže potlačovat agregaci A $\beta$  a rozpouští již vzniklé fibrily. Kolostrinin zlepšuje denní aktivity pacientů s AD a podporuje jejich myšlení. [59]

Další testované látky jsou například melatonin, stemazol a scyllo-inositol. [59], [60]

#### 3.1.6.3.5 Imunoterapie zasahující proti A $\beta$

Imunizace je jednou z velmi důležitých strategií léčby AD, která pomáhá odstraňovat amyloidní plaky. První fáze studia aktivních vakcín proti A $\beta$  prokázala jejich účinnost u zvířat, během testování na lidech byly objeveny u 6 % léčených pacientů vážné nežádoucí účinky (meningoencefalitida), které vedlo k ukončení výzkumu. Pozdější testy u více než poloviny pacientů léčených vakcínou prokázaly přítomnost protilátek. [58], [59]

Jako výhodnější přístup k léčbě se ukázala pasivní imunizace. Monoklonální protilátka bapinezumab disponuje vysokou afinitou k N-konci A $\beta$  a to zejména k A $\beta$  vázaných v placích.

Závažným nežádoucím účinkem je vasogenní edém, který byl objeven ve 3. fázi klinických studií u 17 % případů. [58], [59]

Současně studovanou látkou ve třetí fázi klinických testů je solanezumab, jedná se o monoklonální protilátku, která se váže do centra A $\beta$ , zejména na volný A $\beta$ . Pacienty je dobře snášen a jeví se jako vhodná alternativa k bapinezumabu. [58], [59]

#### 3.1.6.3.6 Glykogensynthasa kinasa 3 $\beta$ inhibitory

Hlavním činitelem hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu je GSK3 $\beta$ , jejíž zvýšená hladina byla objevena ve frontální kůře mozku u pacientů postižených AD. Jednou z vhodných alternativ léčby byla prokázána inhibice tohoto enzymu pomocí lithia, které podle několika studií vykazuje výhodné účinky na učení a chování, další studie tyto výsledky nepotvrdily. Dalším studovaným inhibitorem je tideglusib s potenciálním účinkem na AD a progresivní supranukleární paralýzu. [58], [60]

#### 3.1.6.4 Nefarmakologická léčba

AD je prozatím nevyléčitelná nemoc. Současná léčba pouze mírní příznaky nemoci a je velmi náročná pro nemocného i pečující osoby. V posledních letech se společně s farmakologickou léčbou AD uplatňuje i léčba nefarmakologická, mezi kterou patří: kognitivní stimulace, kognitivní trénink a rehabilitace. [49]

Kognitivní stimulace zahrnuje zapojení pacienta do skupinových aktivit a jeho socializaci. Procvičováním a opakováním stále stejných aktivit zaměřených na potřeby jednotlivce se zabývá kognitivní trénink. Kognitivní rehabilitace zohledňuje postup nemoci v oblastech biologických i psychologických a napomáhá spoluprací rodiny postiženého s odborníky v co největší podpoře dosahování zásadních strategií a cílech důležitých sociálních aktivit pacienta. [50]

## 3.2 *Narcissus* 'Dutch Master'

### 3.2.1 Taxonomické zařazení



Oddělení: Magnoliophyta  
Třída: Liliopsida  
Podtřída: Lilidae  
Řád: Asparagales  
Čeleď: Amaryllidaceae  
Rod: *Narcissus* L.  
Druh: *Narcissus* 'Dutch Master' [61]

Obrázek 1: *Narcissus* 'Dutch Master' [71]

### 3.2.2 Charakteristika čeledi Amaryllidaceae

Byliny čeledi Amaryllidaceae jsou jednoděložné rostliny, vyznačují se cibulemi nebo oddenky. Jedná se o rostliny vytrvalé, jejich plody jsou bobule nebo tobolky, vyznačují se krásnými květy a silicemi. [62], [69] Rostliny této čeledi se nejčastěji vyskytují v severní Africe, jižní Americe a ve Středozeří, obsahují velké množství alkaloidů používaných zejména v tradiční medicíně k léčbě mentálních chorob. [63]

### 3.2.3 Charakteristika rodu *Narcissus* L.

Rod *Narcissus* L. zahrnuje okolo 60 samostatných druhů rostlin, s typickým výskytem ve Středozeří, Asii a severní Africe. Jedná se o vytrvalé byliny s cibulí, které dorůstají malé až střední velikosti. Tyto byliny tvoří jednoduché listy, květy jsou tvořeny na stonku jedním zřídka několika květy v květenství. Květ je tvořen 6 okvětními lístky, které ve spodní části srůstají v trubku. Uprostřed tohoto seskupení se nachází koruna. Okvětní listy u rostlin rodu *Narcissus* mají od bílé po žlutou barvu, koruna bývá od bílé, světle žluté až po oranžovočervenou. Většina druhů těchto bylin kvete na jaře, pár výjimek na podzim. Plodem je tobolka. [63], [67], [70]



### 3.2.4 Morfologický popis *Narcissus* 'Dutch Master'

Kultivar *Narcissus* 'Dutch Master' je vyšlechtěn z *N. pseudonarcissus* L.. Jedná se o jednoděložnou vytrvalou rostlinou s cibulí, dorůstající výšky 45cm. Její květ je žlutý s trumpetovitou korunkou, která má zubatý okraj. Listy jsou jednoduché, celokrajné. Tato rostlina rozkvétá uprostřed jara a je rozšířena v jižní Evropě, Asii a severní Africe. [71], [73]

### 3.2.5 Obsahové látky čeledi Amaryllidaceae a rodu *Narcissus* L.

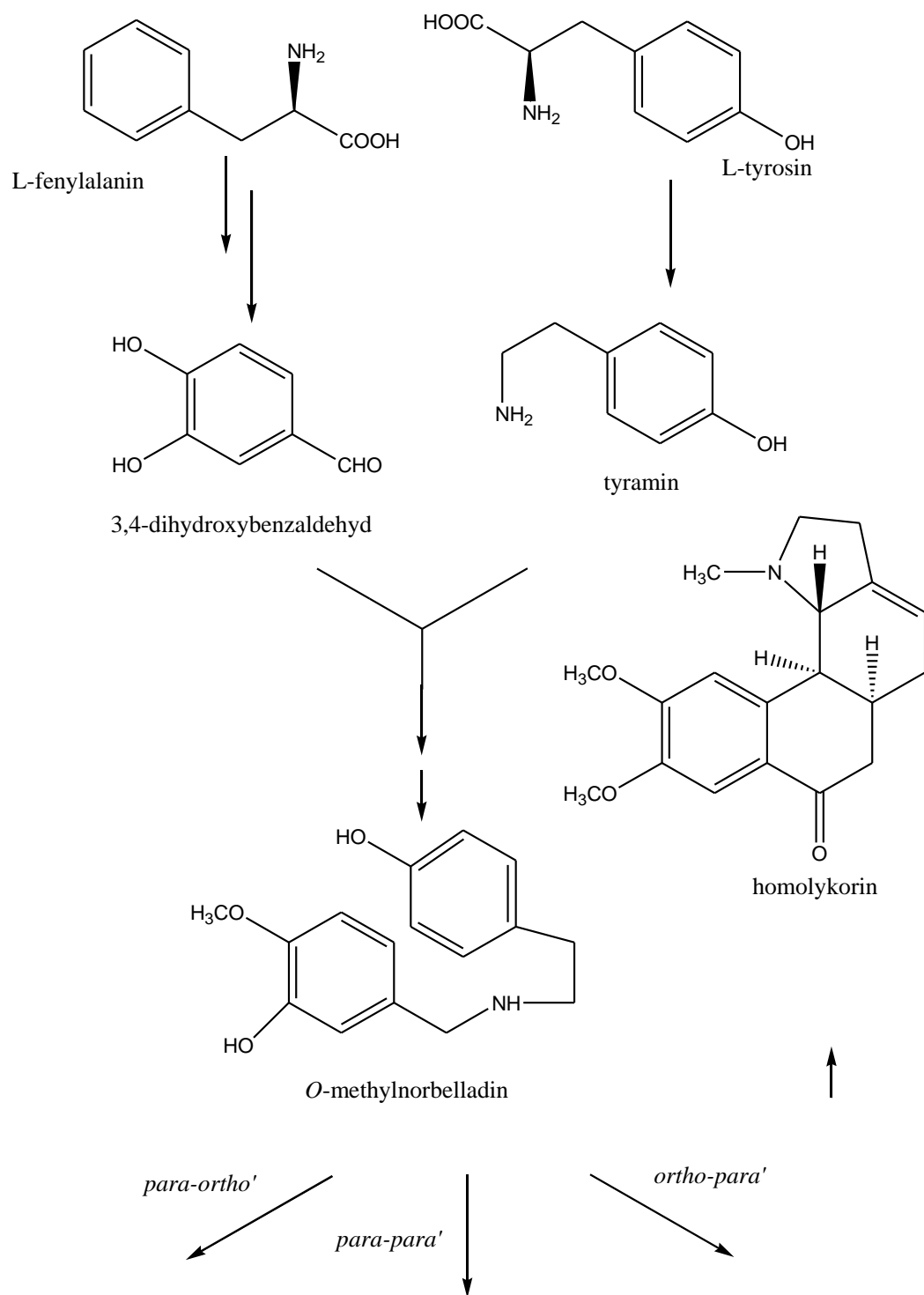
Byliny z čeledi Amaryllidaceae jsou významné pro obsah strukturních typů alkaloidů: lykorinový, homolykorinový, kininový, haemanthaminový, narciklasinový, tazettinový, montaninový a galanthaminový typ. [65] Rostliny čeledi Amaryllidaceae obsahují alkaloidy hlavně v cibuli, i když je lze nalézt v celé rostlině. [72]

Rostliny rodu *Narcissus* v květu obsahují sekundární metabolity, jako jsou karotenoidy, betainy a flavonoidy. [72]

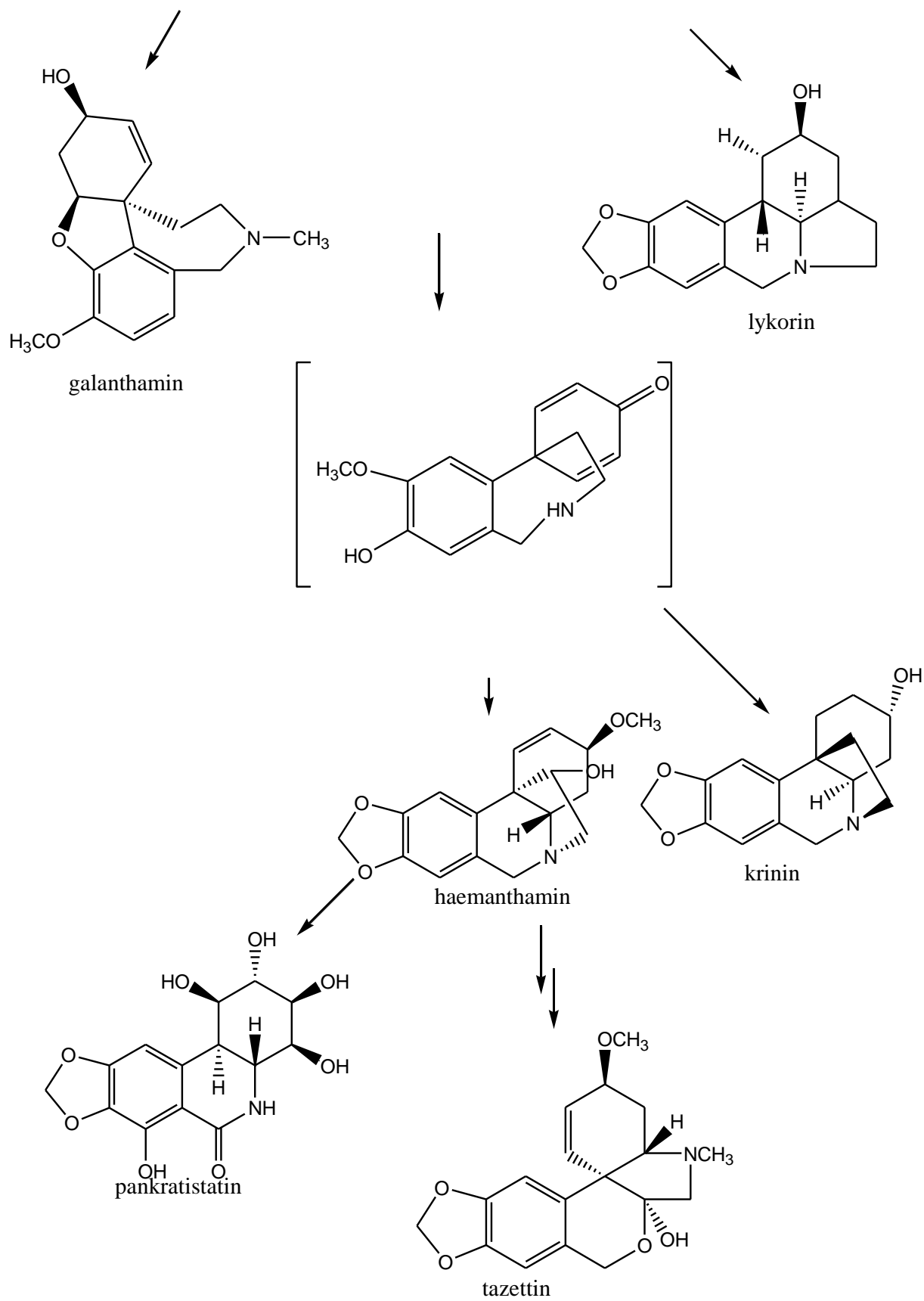
### 3.2.6 Obsahové látky rodu *Narcissus* L. a *Narcissus* 'Dutch Master'

Čeď Amaryllidaceae obsahuje velké množství isochinolinových alkaloidů, ty jsou různě zastoupeny v rodě *Narcissus*.

Alkaloidy čeledi amarylkovité vznikají tzv. norbelladinovou cestou pomocí několika reakcí L-fenylalaninu a L-tyrosinu, kdy vzniká 4'-*O*-methylnorbelladin. [64]



Obrázek 2: Syntéza hlavních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae



Obrázek 3: Syntéza hlavních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (pokračování) [64]

Dalšími reakcemi vzniká sedm struktur:

- lykorinový typ
- homolykorinový typ
- haemanthaminový a krinanový typ
- tazettinový typ
- pankratiistatinový typ
- galanthaminový typ [64]

Rozdělení alkaloidů do jednotlivých strukturních typů není jednoznačně dané, v různých zdrojích se může lišit a to i proto, že nové strukturní typy alkaloidů jsou stále nově izolovány a identifikovány. [68]

Např. u rostliny *Narcissus* cv. 'Dutch Master' byl izolován alkaloid struktury 7-(6'-(hydroxymethyl)benzo[d][1',3']dioxol-5'-yl)-1-methyl-1H-indol-6-ol, tvořící novou strukturu benzodioxoindolového alkaloidu. Tento alkaloid je chirální sloučeninou s názvem 6-hydroxygalathindol. Dále byly izolovány tři glykosidy tohoto alkaloidu:

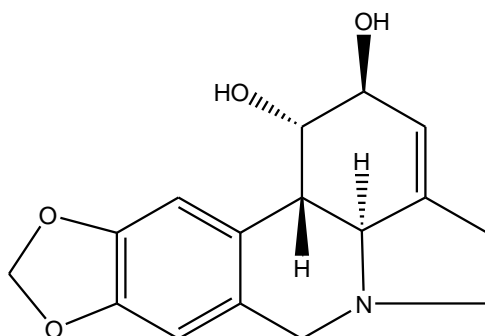
- 6-hydroxygalanthindolyl-6-β-D-glukopyranosid,
- 6-hydroxygalanthindolyl-6-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid
- 6-hydroxygalanthindolyl-6-O-[β-D-xylopyranosyl(1→2)]-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-glukopyranosid. [73]

### 3.2.6.1 Lykorinový typ

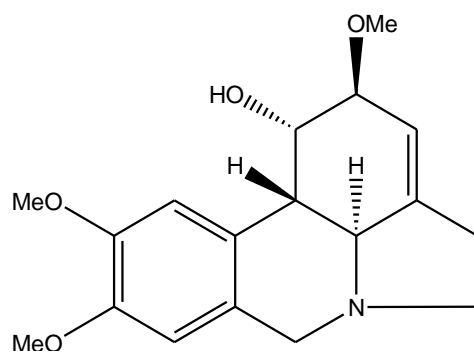
Lykorin je první izolovaný alkaloid z čeledi Amaryllidaceae a to z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* Haw, dále je získáván z *Urginea altissima* (L. f.) Baker z čeledi Hyacinthaceae. Základem lykorinových alkaloidů je pyrolofenanthridinová struktura. Lykorin v rostlinách funguje jako inhibitor kyseliny askorbové, čímž vede k zastavení růstu a dělení buněk a organogenezi. U zvířat vykazuje protinádorovou aktivitu. Tento alkaloid má široké spektrum účinků jako analgetikum, antiarytmikum, antimalaritikum a protizánětlivá látka. Další rozvíjenou vlastností lykorinu je jeho aktivita proti parazitům a houbám. [65], [68]

Dalšími alkaloidy této skupiny jsou karantin, galanthin, pseudolykorin, 2-O-acetylpseudolykorin, tyto látky vykazují stejně jako lykorin protinádorovou aktivitu. Lykorin a pseudolykorin účinně fungují i proti virům. [65]

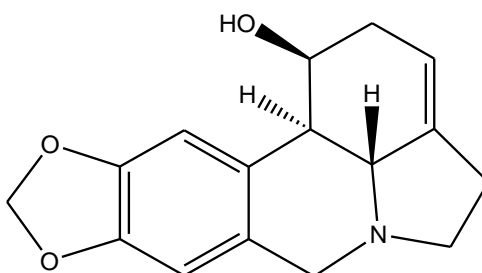
Alkaloidy assoanin, oxoassoanin a lykorin disponují výraznou inhibiční schopností vůči AChE. Galanthin nachází větší uplatnění v oblasti léčby myopatie a myasthenia gravis. [65]



Obrázek 4: lykorin



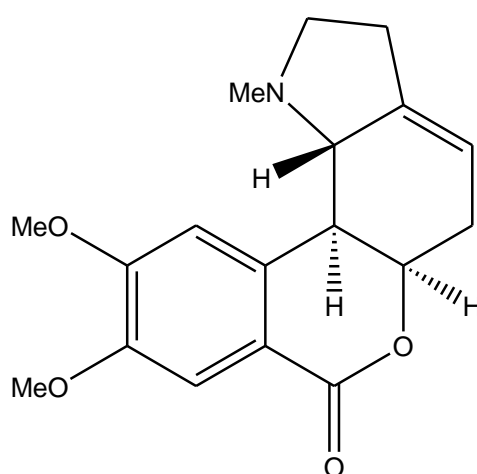
Obrázek 5: galanthin



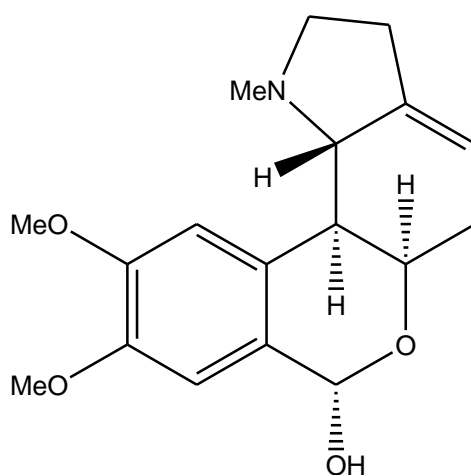
Obrázek 6: karanin

### 3.2.6.2 Homolykorinový typ

Alkaloidy homolykorinového typu jsou tvořeny deriváty 2-benzopirano-[3,4-g]-indolu, mezi které patří homolykorin, 8-*O*-demethylhomolykorin, dubiusin, 9-*O*-demethyl-2 $\alpha$ -hydroxyhomolykorin, hippeastrin, lykorenin a *O*-methyllykorenin. Tyto alkaloidy inhibují růst různých typů nádorových buněk, bohužel cytotoxicky působí i na nenádorové buňky fibroblastů LMTK. Významným alkaloidem tohoto typu je hippeastrin, který vykazuje antivirotický účinek vůči *Herpes simplex* a antimykotický efekt vůči *Candida albicans*. [65] Alkaloid homolykorin je izolován z rostliny *Narcissus tazetta* Linnaeus. [69]



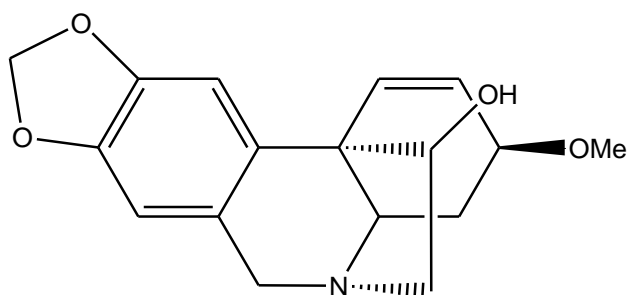
Obrázek 7: homolykorin



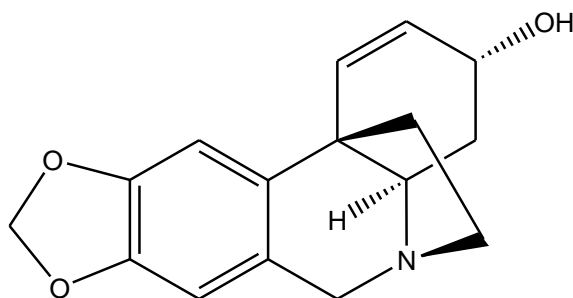
Obrázek 8: lykorenin

### 3.2.6.3 Haemanthaminový a krinanový typ

Struktura haemanthaminových a krinanových alkaloidů je odvozena od 5, 10b-ethanofenanthridinu. Krinamin, pyramin a haemanthamin disponují cytotoxickým účinkem vůči nenádorovým fibroblastovým LMTK buňkám, které spolu s haemanthidinem a maritidinem inhibují růst nádorových buněk. Antioxidační účinek a účinek proti *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* prokazuje krinamin, který se vyskytuje v čeledi Dioscoreaceae a Amaryllidaceae. Alkaloidy haemathamin a haemanthidin vykazují antimalárický účinek proti chlorochin sensitivním *Plasmodium falciparum*. [65], [68]



Obrázek 9: haemanthamin

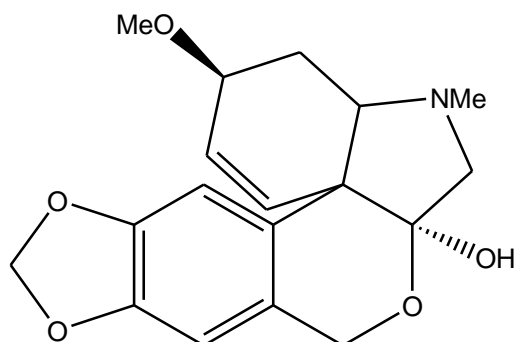


Obrázek 10: krinin

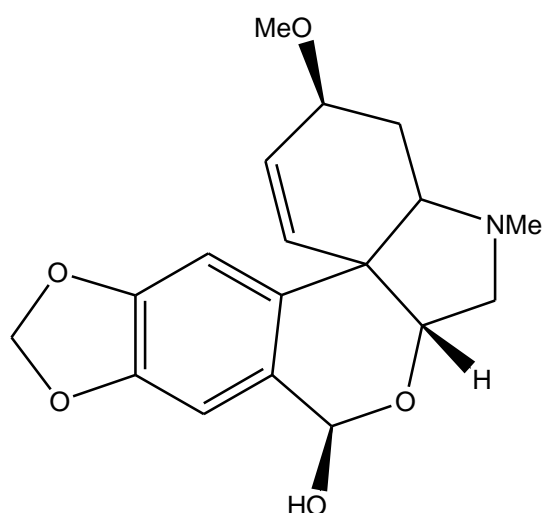
### 3.2.6.4 Tazettinový typ

Tazettinový typ alkaloidů je odvozen od struktury 2-bezopyrano[3,4-c]-indolu, hlavními představiteli jsou dva alkaloidy tazettin a pretazettin. Slabou cytotoxickou aktivitou vůči nádorovým buňkám, ale i vůči fibroblastovým buňkám LMTK vykazuje alkaloid tazettin. Jeho prekurzor pretazettin je však mnohem více biologicky aktivní. Jeho využití je v léčbě

Rauscher leukémie, Ehrlichova karcinomu, Lewisova karcinomu a spontánní AKR lymfocytární leukémie. Dalším významnou schopností je inhibice proteinové syntézy při replikaci viru. [65]



Obrázek 11: tazettin



Obrázek 12: pretazzettin

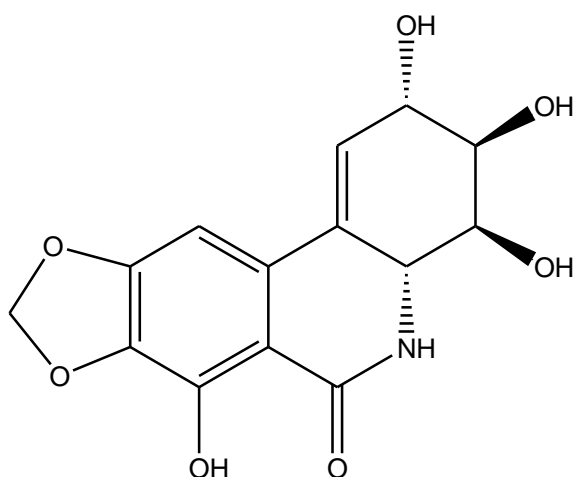
### 3.2.6.5 Pankratistatinový typ

Alkaloidy odvozené od struktury fenanthridinu patří do pankratistatinové skupiny. Tento typ alkaloidů reprezentují dva hlavní zástupci narciklasin a pankratistatin. Narciklasin je inhibitor proteinové syntézy eukaryotických organismů, má protinádorovou aktivitu se schopností indukce apoptózy buněk lidského karcinomu prostaty PC-3 a adenokarcinomu

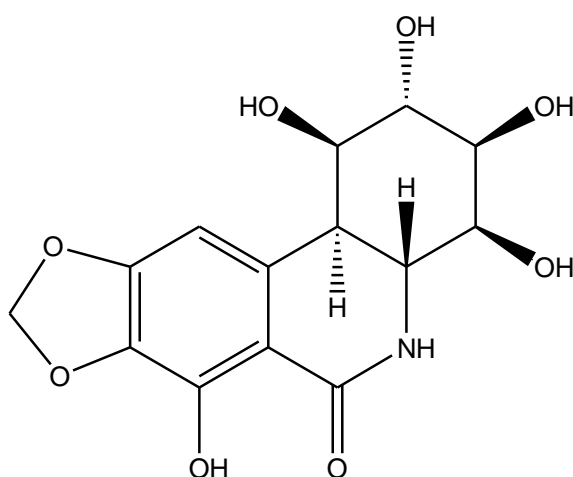


prsu MCF-7. Dále má účinek antifungální, antivirotický proti RNA- virům hemoragické horečky a baktericidní proti *Corynebacterium fascians*. Poprvé byl izolován z cibulí rodu *Narcissus* a to z *Narcissus pseudonarcissus* cv. King Alfred. [69]

Několik studií prokázalo, velmi výhodné účinky alkaloidu pankratistatinu proti různým druhům nádorových buněk. Pankratistatin je účinný proti leukemickým buňkám, buňkám kolorektálního karcinomu a karcinomu prostaty. [64]



Obrázek 13: narciklasin



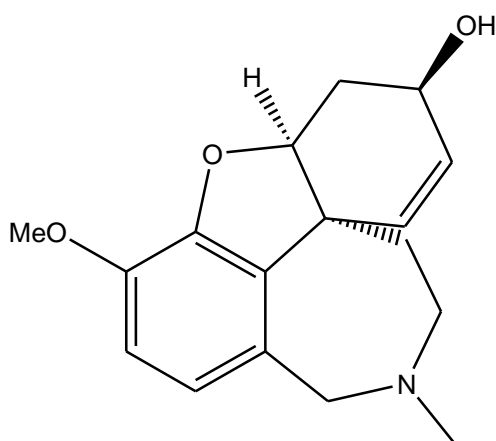
Obrázek 14: pankratistatin

### 3.2.6.6 Galanthaminový typ

Galanthaminový typ alkaloidů je tvořen strukturou dibenzofuranu. Nejznámějším zástupcem této skupiny je galanthamin, který funguje jako selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor AChE. Dále má schopnost stimulovat pre- i postsynaptické nikotinové receptory, čímž zvyšuje uvolňování neurotransmiterů a zlepšuje neuronální funkce. Díky těmto vlastnostem je galanthamin vhodný k léčbě AD, schizofrenie a dalších neuronálních poruch, využití však nachází i jako insekticid. [65], [68]

Hydrobromidová sůl galanthaminu známá pod názvem Reminyl® je využívána při léčbě AD. [66] *Galanthus nivalis* L., *Narcissus pseudonarcissus* Haw cv. 'Carlton' a *N. confusus* Pugsley jsou známé zdroje tohoto alkaloidu. [66], [68]

Další selektivní inhibitor AChE je alkaloid sangunin, u alkaloidu narweidinu byla objevena respirační stimulace. [65]



Obrázek 15: galanthamin

### 3.2.7 Aktivita inhibice AChE testovaných alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae

Testy aktivity inhibice AChE u čeledi Amaryllidaceae bylo zjištěno, že pouze lykorinový a galanthaminový typ vykazuje tuto aktivitu ze všech dříve jmenovaných strukturních typů alkaloidů. [66]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a vybavení

#### 4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- ethanol 95%, denaturovaný metanolem, p. a. (EtOH) (Penta a.s.),
- cyklohexan p. a. (CHx) (Penta a.s.),
- chloroform p. a. (CHCl<sub>3</sub>) (Penta a.s.),
- lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (LB) (Penta a.s.),
- diethylamin p. a. (DEA) (LachNer),
- diethylether (Et<sub>2</sub>O) (Penta a.s.),
- ethyl-acetát (EtOAc) (Penta a.s.),
- toulén p. a. (To) (Penta a.s.),
- destilovaná voda (H<sub>2</sub>O),
- *n*-hexan p. a. (nHx) (Penta a.s.),
- kyselina chlorovodíková 35%, p. a. (HCl) (LachNer),
- uhličitan sodný bezvodý p. a. (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Penta a.s.),
- kyselina vinná p. a. (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.),
- jodid draselný p. a. (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.),
- dusičnan bismutitý zásaditý p. a. (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.).

#### 4.1.2 Pomocné látky

- kyselina chlorovodíková 2% (w/w)
- křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.3 Detekční činidla

- **Dragendorffovo činidlo** – je tvořeno roztoky A a B v poměru 1:1,  
roztok A vzniká z 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné  
rozpuštěných v 80 ml destilované vody  
roztok B vzniká z 16 g jodidu draselného rozpuštěného ve 40 ml destilované vody

- **Mayerovo činidlo** – vzniká z 1,35 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného rozpuštěním v destilované vodě a doplněním do objemu 100 ml

#### 4.1.4 Chromatografické absorbenty

- Kieselgel SiO<sub>2</sub> 60 F254, 20x20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm (Merck)
- oxid hlinitý (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) deaktivovaný 6 % H<sub>2</sub>O, velikost zrn 40-200 μm (ACROSS)

#### 4.1.5 Přístrojové vybavení

- vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Switzerland)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany)
- NMR Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

## 4.2 Obecný postup práce

### 4.2.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Před použitím rozpouštědel byla provedena jejich destilace, kdy prvních 5 % bylo odstraněno z důvodu možného obsahu vody. Dalších asi 90 % destilátu bylo uchováno v hnědých lahvích, které chránily rozpouštědla před světlem.

### 4.2.2 Odpařování extraktů a frakcí

Frakce a podfrakce získané při preparativní chromatografii, byly odpařeny na vodní lázni pomocí vakuové odparky při teplotě do 40 °C za sníženého tlaku.

### 4.2.3 Sušení a skladování frakcí a vyizolovaných čistých látek

Získané frakce a jednotlivé čisté látky byly po odpaření nejprve umístěny do exsikátoru, kde byly ponechány nejméně 24 hodin. Po vysušení vzorků byly uchovány v chladničce při 2-8 °C.

### 4.2.4 Chromatografie

#### 4.2.4.1 Sloupcová chromatografie

Kolona pro sloupcovou chromatografii byla naplněna absorbentem, který tvořil oxid hlinitý neutrální -  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , fa ACROSS, velikost zrn 40-200  $\mu\text{m}$ , deaktivovaný 6 %  $\text{H}_2\text{O}$ . Vzorek byl nanesen na absorbent pomocí roztoku ve směsi s absorbentem.

#### 4.2.4.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je separační metoda vhodná k identifikaci a ověření čistoty alkaloidů jednotlivých frakcí. Při TLC byly využívány komerčně vyráběné desky Kieselgel nebo skleněné desky o rozměrech 15x15 cm, na které byla nalita vodná suspenze silikagelu. Připravované desky musely vysychat minimálně 24 hodin před použitím. Oba druhy desek byly vyvíjeny v uzavřených a mobilní fází nasycených komorách různých velikostí.

Detekce alkaloidů byla provedena pod UV lampou o vlnové délce 254 nm a 366 nm, kdy se alkaloidy projeví jako tmavé skvrny. K rozlišení a zdůraznění jednotlivých alkaloidů

bylo využito Dragendorffovo činidlo, které reaguje s molekulami obsahujícími dusík za vzniku oranžového zbarvení.

#### 4.2.5 Strukturní analýza

##### 4.2.5.1 GC-MS analýza

Jednotlivé izolované alkaloidy se proměřovaly pomocí plynového chromatografu Agilent 7890 A GC 5975 inert MSD využívajícím hmotnostní detektor v režimu EI při 70 eV. K separaci byla použita kolona DP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ, výrobce Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplotní program začínal na 100 °C s nárůstem 15 °C za minutu až do 180 °C, tato teplota byla udržována po dobu 1 minuty. Poté byl teplotní nárůst snížen na 5 °C za minutu až do 300 °C, tato teplota byla udržována 40 minut. Teplota injektoru byla nastavena na 280 °C, detektor na 200°C s detekčním rozmezím m/z 35-600, rychlost průtoku helia (nosný plyn) 0,8 ml/min. Nástřik 1 μl alkaloidu o koncentraci 1 mg/ml probíhal ve „split modu” při poměru 1:10. Při identifikaci jednotlivých alkaloidů byla využita spektra z knihovny NIST, literatura a spektra dříve izolovaných referenčních látek v laboratoři katedry farmaceutické botaniky a ekologie.

##### 4.2.5.2 NMR analýza

NMR spektra byla měřena pomocí přístroje Varian Iniova 500 při pracovní frekvenci pro jádra  $^1\text{H}$  499,9 MHz a pro  $^{13}\text{C}$  jádra 125,7 MHz. Spektra  $^{13}\text{C}$  byla proměřena pomocí 5mm SW širokopásmé sondy.  $^1\text{H}$  spektra byla proměřena v inverzní 5 mm ID PGF sondě za použití standardních pulzních frekvencí. Tato měření byla prováděna v prostředí deuteriochloroformu při 25 °C.

##### 4.2.5.3 Optická otáčivost

Pomocí přístroje polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Germany) byla v prostředí chloroformu při teplotě 25 °C měřena optická otáčivost izolovaných látek.

## 4.3 Stanovení inhibičních aktivit alkaloidů a alkaloidních extraktů

### 4.3.1 Chemikálie

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

- 5mM fosfátový pufr pH 7,4,

#### *Zásobní roztok A*

10mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (v 1 litru roztoku je 1,20 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , nebo 1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , nebo 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ).

#### *Zásobní roztok B*

10mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , nebo 1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , nebo 3,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ).

5mM fosfátový pufr pH 7,4 se připraví smícháním 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B, 300 ml vody

- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného  
8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doředí se jím do 1000 ml

- 100mM fosfátový pufr, pH 7,4

#### *Zásobní roztok A*

200mM roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (v 1 litru roztoku je 24,0 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , nebo 27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , nebo 31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ).

#### *Zásobní roztok B*

200mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (v 1 litru roztoku je 28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , nebo 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , nebo 71,63 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ).

100mM fosfátový pufr pH 7,4 se připraví smícháním 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

#### 4.3.2 Materiál

- AChE: zdrojem hemolyzát lidských erytrocytů
- BChE: zdrojem lidská plazma

#### 4.3.3 Přístroje

- ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

#### 4.3.4 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny při těchto podmínkách:

- v mikrotitračních destičkách
- při teplotě 37 °C
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm (AChE) a 412 nm (BChE)
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)

#### 4.3.5 Příprava erytrocytární AChE a BChE z plazmy

Krev odebraná zdravým dobrovolníkům slouží k získání erytrocytů, je odebírána do zkumavek s protisrážecí přísadou (18 ml krve + 2 ml 3,4% citrátu). Zkumavky byly hned po odběru centrifugovány při teplotě 4 °C rychlostí 400 rpm po dobu 10 minut. Z odstředěné krve se odebere plazma, která byla využita pro stanovení BChE před stanovením se uchovává v lednici při teplotě 4 °C (nejdéle 6 hodin) a zbylá část se z povrchu sedimentu odsaje pomocí bezpopelového papírku s hlazeným povrchem a sestřiženou špičkou.

Odstředěná erytrocytární masa byla podle objemu rozdělena do 8 zkumavek a zředěna stejným množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného. Erytrocyty s pufrům ve zkumavkách zaujímaly objem 12 ml. Opět se provede centrifugace za stejných podmínek, které byly zmiňovány výše. Erytrocyty se takto promyly 3x a odstranil se veškerý pufr použitý k proplachování. Následně byl přidán 5mM fosfátový pufr pH 7,4 bez



chloridu sodného do takového objemu, aby poměr mezi erythrocyty a pufrům byl 1:9. Takto upravené směs se homogenizovala a poté se přelila do Erlenmayerovy baňky, kde se erythrocyty nechaly při míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm samovolně hemolyzovat. Po tomto procesu se změnila aktivita, v případě potřeby se upravila pomocí 5mM fosfátového pufru absorbance (hodnoty 0,08-0,15) a hemolyzát byl uchován při teplotě -22 °C do dalšího použití.

Plazma byla proměřena a uchovávána stejným způsobem hodnota absorpce musí být v rozmezí 0,15-0,20.

#### 4.3.6 Stanovení inhibiční cholinesterasové aktivity (hodnoty IC<sub>50</sub>)

Inhibiční aktivita (hodnota IC<sub>50</sub>) byla změřena pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody za využití 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTBN). Používanými substráty jsou estery thiocholinu, které reakcí s cholinesterasami tvoří žluté produkty. Tyto produkty jsou spektrofotometricky proměřeny při vlnové délce 436 nm po dobu 1 minuty. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočítány z naměřených hodnot absorbance pomocí nelineární regrese v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Vypočítaná hodnota IC<sub>50</sub> v µg/ml byla porovnána s referenčními látkami galanthaminem, fysostigminem a HupA. Procentuální vyjádření IC<sub>50</sub> bylo vypočítáno podle vzorce:  $I = 100 - (\Delta ABL / \Delta ASA) \times 100$ ;  $\Delta ABL$  je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu,  $\Delta ASA$  je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Aktivita enzymů se měří na mikrotitračních destičkách, kam se do jamek napipetuje 8,3 µl hemolyzátu nebo plazmy, dále se přidá 283 µl 5mM DTNB a 8,3 µl DMSO. Tato směs se promíchá pomocí mikrotřepačky a inkubuje se při 37 °C po dobu 5 minut v komoře readeru. Po inkubaci následuje přidavek 33,3 µl substrátu (acetylthiocholinjodidu nebo butyrylthiocholinjodidu) a proměří se absorbance při určené vlnové délce (AChE-hemolyzát: 436 nm; BChE-plazma: 412 nm). Aktivita látek a extraktů se stanovuje stejným postupem, liší se pouze v koncentracích.

Koncentrace pro látky: 40, 10, 4, 1, 0,4 mM

Koncentrace pro extrakty: 20, 2, 0,2, 0,02, 0,002 mg/ml

## 4.4 Izolace alkaloidů

### 4.4.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál byl objednán u firmy Lukon Glands (Sadská, Česká republika). Droga byla dodána v množství 27,247 kg cibulí *Narcissus* 'Ducht Master'. Verifikace byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc.

### 4.4.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Alkaloidní extrakt byl připraven a dále zpracován pomocí sloupcové chromatografie Mgr. Danielou Hulcovou v rámci její disertační práce.

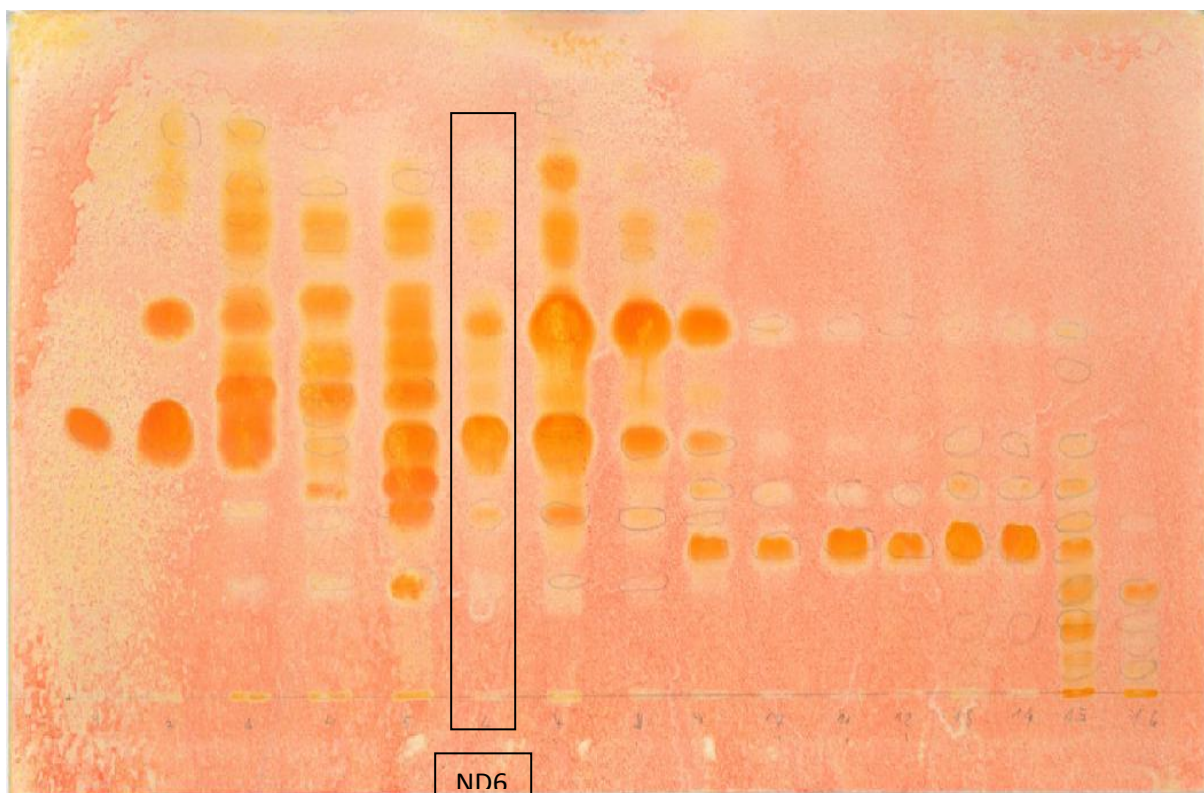
27,247 kg cibulí drogy bylo extrahováno vyvařením v 96% lihu po dobu 30 minut. Tato extrakce probíhala po částech, kdy bylo zpracováno 500 g cibulí vyvařených ve 2x2l lihu. Poté byly tyto spojené extrakty odpařeny na vakuové odparce. Získaný extrakt (450 g) byl rozpuštěn ve 2% HCl (1 l) a doplněn na objem 5 l. Vzniklá směs byla zfiltrována přes křemelinu. Tento filtrát byl 3x extrahován pomocí etheru (3x 1,5l) a poté alkalizován na pH=9–10 za využití 10% uhličitanu vápenatého. Suspenze byla extrahována do ethylacetátu (3x 1,5l) a to 3x. Ethylacetátový extrakt byl odpařen na 95 g a poté znovu rozpuštěn v 500ml 2% HCl a znovu 3x extrahován etherem (3x 300ml). Kyselý roztok alkaloidů byl zalkalizován 10% uhličitanem vápenatým na pH=10 a vodný extrakt přetřepán 4x etherem (4x 350 ml). Vodná část roztoku byla ještě přetřepána 4x chloroformem (4x 350 ml). Oba výtřepky byly spojeny a odpařeny. Bylo získáno 58,25 g produktu.

### 4.4.3 Sloupcová chromatografie

Pomocí sloupcové chromatografie byl výtřeppek separován do několika frakcí. Použitá kolona naplněná stacionární fází neutrálního oxidu hlinitého ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , fa ACROSS, velikost zrn 40-200  $\mu\text{m}$ ) deaktivovaného 6%  $\text{H}_2\text{O}$ , v množství 2500 g, byla 62 cm vysoká, 7,1 cm široká, mrtvý objem činil 2,3 l. Získaný extrakt o hmotnosti 58,25 g byl smíchán s  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v poměru 5:1 a navrstven na stacionární fázi kolony. Směs  $\text{CHCl}_3$  + benzínu (3:7, 2:3, 1:1, 3:1), poté čistý chloroform a nakonec směs EtOH +  $\text{CHCl}_3$  (1:1) byly použity jako mobilní fáze eluce. Z eluce bylo odebráno 301 frakcí, které byly podle shodnosti jejich TLC spojeny do 16 frakcí.

Tabulka 1: Výsledky sloupcové chromatografie

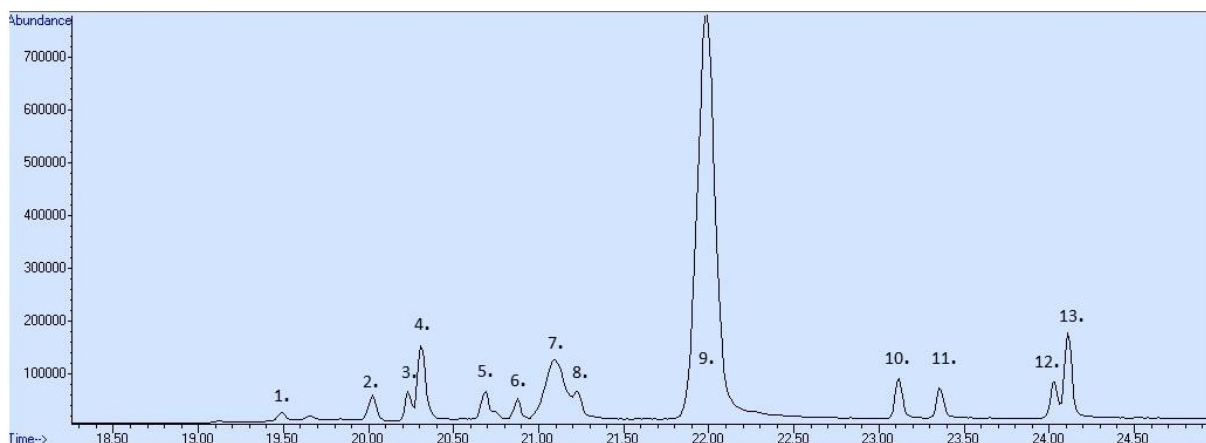
<b>název frakce</b>	<b>spojené frakce</b>	<b>hmotnost (g)</b>
<b>ND1</b>	46-51	0,4
<b>ND2</b>	51-57	1,11
<b>ND3</b>	58-82	9,3801
<b>ND4</b>	83-94	2,4861
<b>ND5</b>	95-138	7,8462
<b>ND6</b>	139-165	3,2142
<b>ND7-8</b>	166-194	4,8267
<b>ND9-10</b>	195-206	1,1092
<b>ND11-14</b>	207-289	14,9347
<b>ND15</b>	290-292	7,24
<b>ND16</b>	293-301	1,68
<b>Celkem</b>		54,2272



Obrázek 16: Kontrolní TLC spojených frakcí z alkaloidního výtřepku (Adsorbent SiO<sub>2</sub>, MF: To + DEA 9:1, vyvíjeno 1x, CHX + DEA 9:1, vyvíjeno 2x, detekce pod UV + Dragendorffovo činidlo)

#### 4.4.4 Separace a čištění alkaloidů z frakce ND6 (3,214 g)

GC-MS analýza (Obrázek 17) ukázala přítomnost 13 alkaloidů z velké části homolykorinového typu (alkaloidy 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 a 13). Pro tento typ alkaloidů je typický molekulární ion  $m/z$  109. Porovnáním získaných dat z databází NIST, alkaloid číslo 11 vykazoval 96,4% strukturní shodu s galanthinem, dále byla prokázána 77,7% shoda alkaloidu číslo 10 s masoninem. Ostatní alkaloidy se podle této databáze nepodařilo určit.



Obrázek 17: GC chromatogram frakce ND6

Frakce ND6 o hmotnosti 3,214 g byla rozpuštěna ve 45 ml  $\text{CHCl}_3$ . Poté byla provedena preparativní TLC na 60 deskách (absorbent  $\text{SiO}_2$  60 F254, fa Merck, 10x20 cm, dráha 18 cm vyvíjeno 4x), byla použita mobilní fáze To + DEA v poměru 9:1. Vyškrabány byly čtyři alkaloidy ze zón  $R_{f1} = 0,78$ ,  $R_{f2} = 0,52$ ,  $R_{f3} = 0,38$  a  $R_{f4} = 0,28$ , které byly eluovány směsí  $\text{CHCl}_3$  + EtOH (1:1). Bylo získáno ND6/1= 0,39 g, ND6/2= 0,45 g, ND6/3= 1,8 g, ND6/4= 0,4 g.

Tabulka 2: Podfrakce ND6

Frakce	Hmotnost (g)	R <sub>f</sub>
ND6/1	0,39	0,78
ND6/2	0,45	0,52
ND6/3	1,8	0,38
ND6/4	0,4	0,28

#### 4.4.5 Separace a čištění alkaloidů z frakce ND6/2 (450 mg)

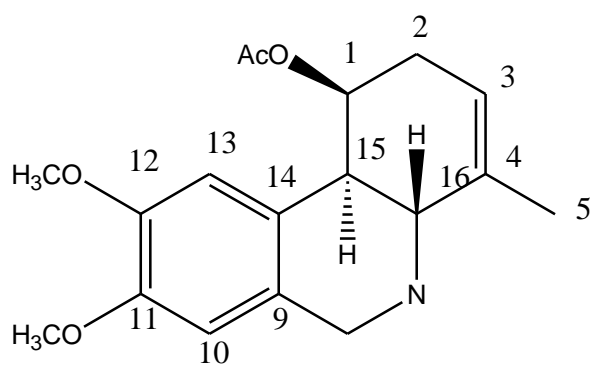
Frakce byla separována pomocí TLC na 30 deskách (absorbent  $\text{SiO}_2$  60 F254, fa Merck, 10x20 cm, dráha 18 cm vyvíjeno 3x). Použitá mobilní fáze CHX + DEA (9:1) vzorek rozdělila na 4 hlavní zóny  $R_{f1}$  0,68,  $R_{f2}$  0,42,  $R_{f3}$  0,22 a  $R_{f4}$  0,13. Zóny byly vyškrabány a eluovány  $\text{CHCl}_3$  + EtOH (1:1). Dále byla zkontrolována jejich čistota opětovným TLC v soustavě CHX + DEA (9:1).

Podfrakce o  $R_{f2}$  0,42 a hmotnosti 33 mg byla vyvinuta na 3 deskách (absorbent  $\text{SiO}_2$  60 F254, fa Merck, 10x20 cm, dráha 18 cm vyvíjeno 2x) v mobilní fázi CHX + DEA (9:1), byla získána jedna hlavní zóna o  $R_{f}$  0,56. Tato zóna byla vyškrabána a eluována směsí  $\text{CHCl}_3$  +

EtOH (1:1). Získáno bylo 14,7 mg směsi s označením ND6/2/2/2, která byla znovu přečištěna na 2 deskách (absorbent SiO<sub>2</sub> 60 F254, fa Merck, 10x20 cm, dráha 18 cm vyvíjeno 2x) s mobilní fází EtOAc + CHX (1:1) a byl získán amorfní alkaloid (**LV-1**) nažloutlé barvy s hmotností 8 mg a Rf 0,7.

## 5 Výsledky

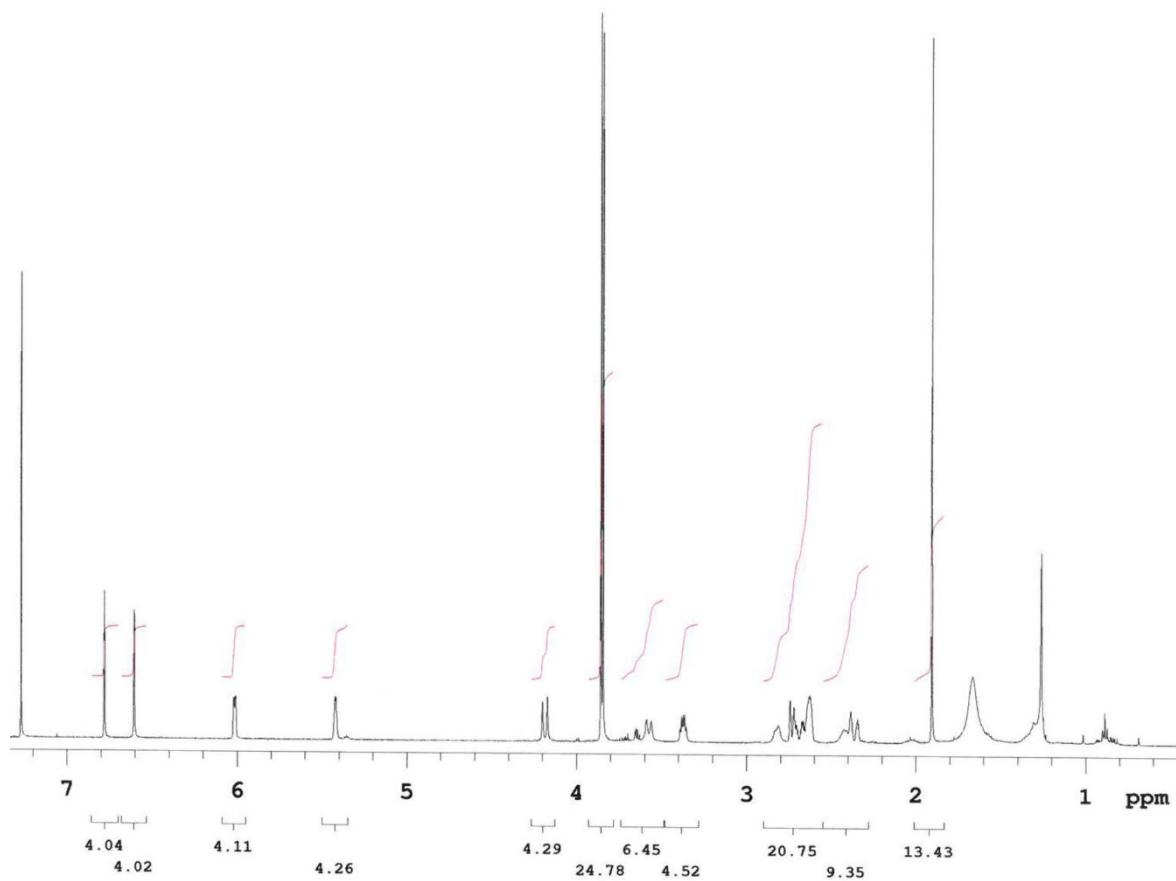
### 5.1 Strukturní analýza LV-1 (*O*-acetylpluviin)



Obrázek 18: *O*-acetylpluviin

### 5.1.1 NMR

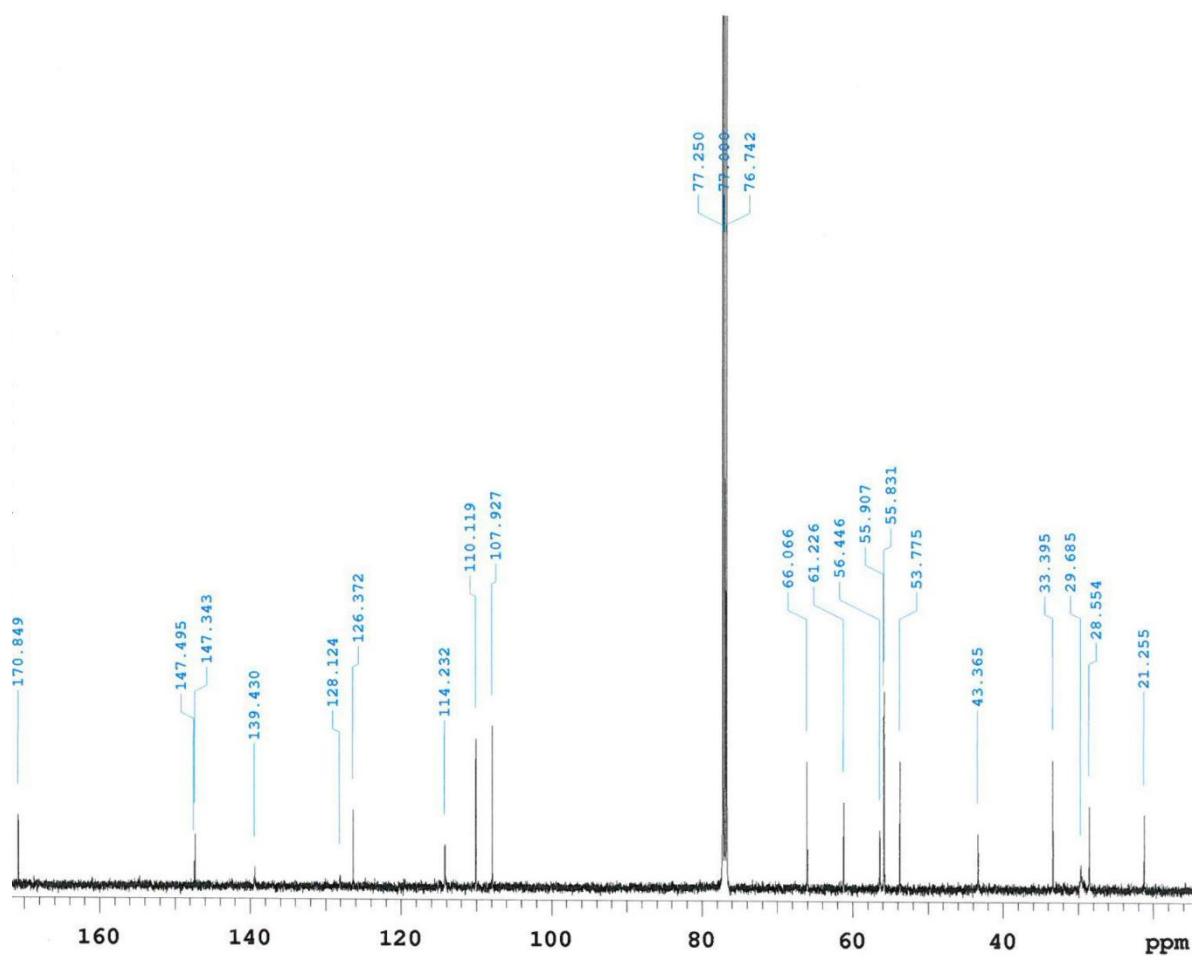
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.78 (1H, s, H13), 6.61 (1H, s, H10), 6.02 (1H, d,  $J=4.0$  Hz, H1), 5.44-5.40 (1H, m, H3), 4.19 (1H, d,  $J=13.6$  Hz, H8), 3.86 (3H, s, OCH3), 3.85 (3H, s, OCH3), 3.58 (1H, d,  $J=13.6$  Hz, H8), 3.40-3.34 (1H, m, H6), 2.86-2.79 (1H, m, H16), 2.76-2.60 (4H, m, H2, H5, H15), 2.46-2.40 (1H, m, H6), 2.40-2.33 (1H, m, H2), 1.91 (3H, s, CH3)



Obrázek 19:  $^1\text{H}$  NMR spektrum *O*-acetylpluviinu

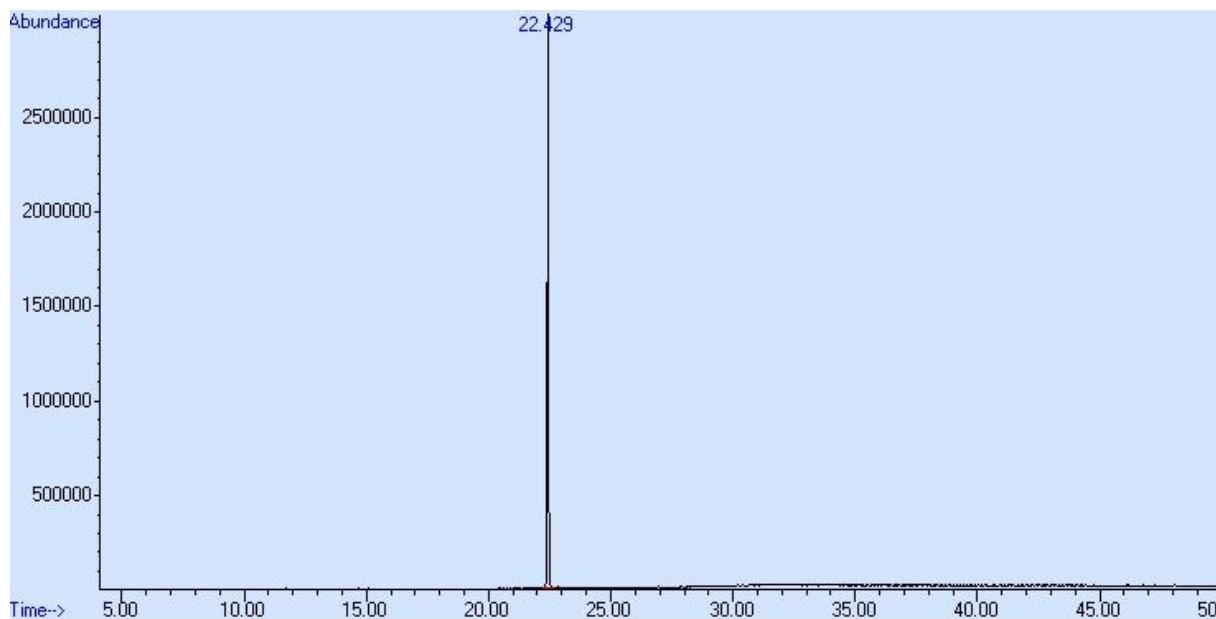


$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.9 (CO), 147.5 (C11), 147.3 (C12), 139.4 (C4), 128.1 (C9), 126.4 (C14), 114.2 (C3), 110.1 (C10), 107.9 (C13), 66.1 (C1), 61.2 (C16), 56.4 (C8), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 53.8 (C6), 43.4 (C15), 33.4 (C2), 28.6 (C5), 21.3 (CH<sub>3</sub>)



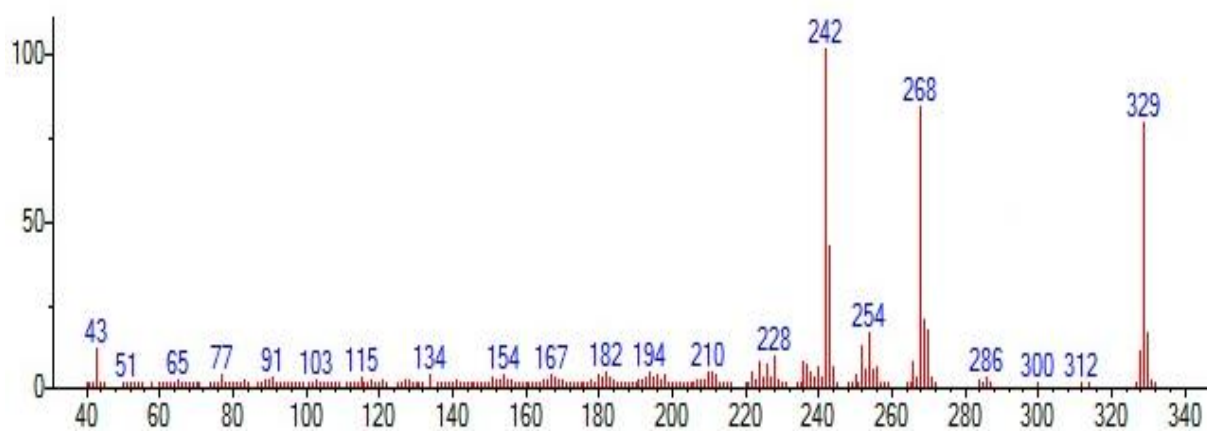
Obrázek 20:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum *O*-acetylpluviinu

### 5.1.2 GC-MS



Obrázek 21: GC chromatogram *O*-acetylpluviinu

Ei-MS (m/z) 330(16), 329(78), 270(17), 269(20), 268(83), 254(16), 243 (41), 242(100)



Obrázek 22: MS-EI spektrum *O*-acetylpluviinu

### 5.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_{D_{25}} = -83^{\circ}$  (c 0,08,  $\text{CHCl}_3$ )

## 5.2 Cholinesterasová inhibiční aktivita

Tabulka 3: Cholinesterasová inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu LV-1 (O-acetylpluviin)

<b>Sloučenina</b>	<b>AChE (IC<sub>50</sub>, μM)</b>	<b>BuChE (IC<sub>50</sub>, μM)</b>
<b>O-acetylpluviin</b>	648,03 ± 53,95	602,50 ± 48,50
<b>Galanthamin*</b>	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
<b>Huperzin A*</b>	0,033 ± 0,001	>1000
<b>Fysostigmin*</b>	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

\*standardní inhibitory cholinesteras

## 6 Diskuze

U rostlin čeledi Amaryllidaceae rodu *Narcissus* L. bylo objeveno velké množství biologických účinků jedním z nejvýznamnějších je schopnost inhibovat činnost acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy, čehož se využívá v terapii AD.

Pro hledání nových perspektivních inhibitorů cholinesteras byl použit alkaloidní extrakt *Narcissus* 'Dutch Master' připravený a zpracovaný sloupcovou chromatografií Mgr. Danielou Hulcovou. Tento extrakt byl podroben analýze, kde byla objevena výhodná inhibiční aktivita vůči BChE ( $IC_{50 \text{ BChE}} = 25,5 \pm 0,8 \text{ g/ml}$ ). Tato práce se zabývá alkaloidem izolovaným z frakce ND6, z které byla použita podfrakce 2 získaná tenkovrstvou chromatografií.

Z podfrakce 2 se v dostatečném množství podařilo izolovat lykorinový typ alkaloidu *O*-acetylpluviin, jehož struktura byla určena na základě MS, NMR analýzy a optické otáčivosti. Tento alkaloid byl dříve izolován z *N. cv. Ice Follies* a *Galanthus rhizenensis* Stern. U rostliny *G. rhizenensis* byla již dříve testována inhibiční acetylcholinesterasová aktivita lykorinových alkaloidů. [74], [75]

Izolovaný alkaloid byl testován *in vitro* na jeho inhibiční cholinesterasovou aktivitu vůči lidským cholinesterasám – lidské erytrocytární AChE a sérové BChE. Jeho výsledná aktivita byla porovnána se standardy galanthaminem, huperzinem A a fysostigminem. *O*-acetyllykorin vykazoval slabou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám ( $IC_{50 \text{ AChE}} = 648,03 \pm 53,95$ ,  $IC_{50 \text{ BChE}} = 602,50 \pm 48,50$ ) v porovnání s galanthaminem ( $IC_{50 \text{ AChE}} = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ BChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ ), huperzinem A ( $IC_{50 \text{ AChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ BChE}} >1000 \mu\text{M}$ ) a fysostigminem ( $IC_{50 \text{ AChE}} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ BChE}} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$ ). Z hlediska zjištěné cholinesterasové aktivity tato látka nevykazuje zajímavou cholinesterasovou inhibiční aktivitu, a tudíž se nejvíce jeví jako potenciální inhibitor cholinesteras využitelný v terapii AD.

Přestože *O*-acetylpluviin nevykazoval výraznou cholinesterasovou inhibiční aktivitu, můžeme mezi lykorinovými alkaloidy najít zástupce s výraznou inhibiční aktivitou: lykorin ( $IC_{50 \text{ AChE}} = 29,3 \pm 3,15 \mu\text{M}$ ) a 2-*O*-tert-butyldimethylsilyl-1-*O*-(methylthio)methyllykorin ( $IC_{50 \text{ AChE}} = 11.40 \pm 0.66 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ BChE}} = 4.17 \pm 0.29 \mu\text{M}$ ). [76], [77]

## 7 Závěr

Z vybrané frakce alkaloidního výtřepku z *Narcissus* 'Dutch Master' byl izolován alkaloid *O*-acetylpluviin, jehož struktura byla určena na základě MS, NMR a optické otáčivosti. Získaná data byla porovnána s literaturou. Alkaloid byl izolován v dostatečném množství (8 mg) na strukturní analýzu a cholinesterasovou inhibiční aktivitu, tudíž další biologická aktivita nemohla být změřena (inhibice prolyloligopeptidasy a cytotoxicita). Alkaloid vykazoval slabou inhibiční cholinesterasovou aktivitu ( $IC_{50\text{ AChE}} = 648,03 \pm 53,95 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50\text{ BuChE}} = 602,50 \pm 48,50 \mu\text{M}$ ), z tohoto hlediska se jeví jako nevyužitelný v terapii AD.

## 8 Abstrakt

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

Z vybrané frakce ND-6, která byla získána ze sloupcové chromatografie alkaloidního výtřepku z *Narcissus* 'Dutch Master' (příprava alkaloidního extraktu a sloupcová chromatografie byla provedena Mgr. Danielou Hulcovou v rámci její doktorské práce), za použití preparativ TLC byl z vybrané frakce ND-6 izolován lykorinový alkaloid *O*-acetylpluviin. Jehož struktura byla určena na základě MS, NMR analýzy a optické otáčivosti, získaná data byla porovnána s literaturou.

U získaného alkaloidu byla změřena jeho inhibiční cholinesterasová aktivita vůči lidské acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Aktivita alkaloidu byla vyjádřena hodnotami  $IC_{50}$  ( $IC_{50} AChE = 648,03 \pm 53,95 \mu M$ ,  $IC_{50} BChE = 602,50 \pm 48,50 \mu M$ ) a porovnána s hodnotami  $IC_{50}$  galanthaminu, huperzinu A a fysostigminu. Ze získaných hodnot jsme zjistili, že získaný alkaloid má velmi nízkou inhibiční cholinesterasovou aktivitu a není vhodný z hlediska inhibice cholinesteras k potenciálnímu využití v terapii AD.

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

## 9 Abstract

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

From a selected fraction ND-6, which was obtained by column chromatography of an alkaloid extract of *Narcissus* 'Dutch Master' (preparation of the alkaloid extract and column chromatography was performed by Mgr. Daniela Hulcová within her doctoral thesis), lycorine alkaloid *O*-acetylpluviin was isolated using preparative TLC. Its structure was determined on the basis of MS, NMR analysis, and optical rotation, the obtained data were compared with the literature.

The isolated alkaloid was tested on its possibility to inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The activity was expressed as IC<sub>50</sub> values (IC<sub>50</sub> AChE = 648.03 ± 53.95 μM, IC<sub>50</sub> BChE = 602.50 ± 48.50 μM) and compared with IC<sub>50</sub> values of galanthamine, huperzine A and physostigmine. *O*-acetylpluviine showed a very low inhibitory cholinesterase activity, and so, the alkaloid does not seem to be a suitable cholinesterase inhibitor for potential use in the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: *Narcissus* 'Dutch Master', Amaryllidaceae, lycorine alkaloids, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

## 10 Literatura

- [1] Benešová J. Seniorů přibylo. Nejvíce na Karlovarsku. Statistika&My. 2016, roč. 6, č. 1, s. 20-21, ISSN 1804-7149.
- [2] Ambler Z. Neurologické poruchy a základní principy farmakoterapie staršího věku. Interní medicína pro praxi. 2009, roč.11, č.4, s. 182-185.
- [3] Konrád J. Kognitivní poruchy ve stáří. Psychiatrie pro praxi. 2005, roč. 6, č. 5, s. 227-230.
- [4] Krombholz R. Nejčastější demence a jejich léčba. Neurologie pro praxi. 2011, roč. 12, č. 3, s. 196-200.
- [5] Amemori T., Jendelova P., Ruzicka J., Machova, Urdzikova L., Sykova E. Alzheimer's Disease: Mechanism and Approach to Cell Therapy. Jellinger KA, ed. International Journal of Molecular Sciences. 2015, roč. 16, č.11, s. 26417-26451, ISSN: 14220067.
- [6] Aygün D., Güngör İL. Why is Alzheimer disease confused with other dementias? Turkish Journal of Medical Sciences. 2015, roč. 45, č. 5, s. 1010-1014, ISSN: 13000144.
- [7] Hort J., O'Brien J. T., Gainotti G., Ainotti, Pirttila T., Popescu B. O., Rektorova I., Sorbi S. a Scheltens P. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. European Journal of Neurology. 2010, roč. 17, č. 10, s. 1236-1248, ISSN: 13515101.
- [8] Růžička E., Holmerová I., Höschl C., Jiráček R., Línek V., Pidrman V., Raboch J., Rektorová I., Topinková E. Diferenciální diagnostika a léčba demencí. 2003, roč. 1. ISBN: 80-7262-205-6.
- [9] Reitz C., Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochemical pharmacology. 2014 roč. 88, č.4, s. 640-651, ISSN: 00062952.
- [10] Agrawal M., Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. Frontiers in Molecular Biosciences. 2015, roč. 2, s. 54, ISSN: 2296889X.



- [11] Leeuwen L., Hoozemans J. Physiological and pathophysiological functions of cell cycle proteins in post-mitotic neurons: implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 2015, roč. 129, č. 4, s. 511-525, ISSN: 00016322.
- [12] Dorostkar M., Zou C., Blazquez-Llorca L., Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*. 2015, roč. 130, č. 1, s. 1-19, ISSN: 1432 0533.
- [13] Preis M., Kučerová H., Fanfrdlová Z., Javůrková A., Klempíř J., Krivošíková M., Nováková O., Preis J., Mohaplová M., Kuliščík P. *Neuropsychologie v neurologii*. 2006, s. 130-131, ISBN: 80-247-0843-4.
- [14] Awasthi M., Singh S., Pandey V.P., Dwivedi U.N. Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the neurological sciences*. 2016, roč. 361, s. 256-71, ISSN: 0022510X.
- [15] Folch, Jaume; Petrov, Dmitry; Ettcheto, Miren; Abad, Sonia; Sánchez-López, Elena; García, M. Luisa; Olloquequi, Jordi; Beas-Zarate, Carlos; Auladell, Carme; Camins, Antoni. *Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. Neural Plasticity*. 2016, s. 1-15. ISSN: 20905904.
- [16] Singh M., Kaur M., Chadha N., Silakari O. Hybrids: a new paradigm to treat Alzheimer's disease. *Molecular Diversity*. 2016, roč., 20, č. 1, s. 271-297, ISSN: 13811991.
- [17] Jiráček R., Koukolík F. *DEMENCE: Neurobiologie, klinický obraz terapie*. 2004, s. 146, ISBN: 80-7262-268-4.
- [18] Jiráček R. Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Česká a Slovenská Psychiatrie*. 2015, roč. 111, č. 3, s. 127-131, ISSN: 12120383.

- [19] Fodero T., Michelle, Villemagne Victor L., Rowe Christopher C., Masters Colin L., Barnham, Kevin J., Cappai, Roberto. Molecules in focus: Amyloid- $\beta$ . International journal of biochemistry & cell biology. roč. 43, č. 9, s. 1247, ISSN: 13572725.
- [20] Craig, Laura A., Nancy S. Hong a Robert J. MCDONALD. Review: Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2011, roč. 35, č. 6, s. 1397-1409, ISSN: 01497634.
- [21] Raboch J., Cesková E., Beran J., Pavlovský P. Psychiatrie. 2012, ISBN: 978-80-246-1985-9.
- [22] Barage, Sagar H. a Kailas D. SONAWANE. News and reviews: Amyloid cascade hypothesis. Neuropeptides. 2015, roč. 52, s. 1-18, ISSN: 01434179.
- [23] Contestabile Antonio. Review: The history of the cholinergic hypothesis. Behavioural brain research. 2011, roč. 221, č. 2, s. 334, ISSN: 01664328.
- [24] Huang, Y., Mahley Robert W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. Neurobiology of disease. 2014, roč. 72, s. 3-12, ISSN: 09699961.
- [25] El Haj M., Antoine P., Amouyel P., Lambert J.-C., Pasquier F., Kapogiannis D. Apolipoprotein E (APOE)  $\epsilon$ 4 and episodic memory decline in Alzheimer's disease: A review. Ageing research reviews. 2016, roč. 27, s. 15-22, ISSN: 15681637.
- [26] Yang C., Liu Y., Ni X., LI N., Zhang B., Fang X. Enhancement of the nonamyloidogenic pathway by exogenous NGF in an Alzheimer transgenic mouse model. Neuropeptides. 2014, roč. 48, č. 4, s. 233-288, ISSN: 15322785.
- [27] Niewiadomska G., Amietelska-Porowska A., Mazurkiewicz M. Review: The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. Behavioural Brain Research. 2011, roč. 221, č. 2, s. 515-526, ISSN: 01664328.

[28] Abbayya K., Puthanakar N.Y., Naduwinmani S., Chidambar Y.S. Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North American journal of medical sciences*. 2015, roč. 7, č. 6, s. 241-246, ISSN: 22501541.

[29] Heneka M., Carson Monica J., Khoury Joseph El., Landreth Gary E., Brosseron Frederic, Feinstein Douglas L., Jacobs Andreas H., Wyss-Coray Tony, Vitorica Javier, Ransohoff Richard M., Herrup Karl, Frautschy Sally A., Finsen Bente, Brown Guy C., Verkhratsky A., Yamanaka Koji, Koistinaho Jari, Latz Eicke, Halle Annett, Petzold Gabor C., Town Terrence, Morgan Dave, Shinohara Mari L., Perry V. Hugh, Holmes Clive, Bazan Nicolas G., Brooks David J., Hunot Stéphane, Joseph Bertrand, Deigendesch Nikolaus, Garaschuk Olga, Boddeke Erik, Dinarello Charles A., Breitner John C., Cole Greg M., Golenbock Douglas T., Kummer Markus P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet neurology*. 2015, roč. 14, č. 4, s. 388-405, ISSN: 14744422.

[30] Wen-Juan Huang, Xia Zhang, Wei-Wei Chen. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*. 2016, roč. 4, č. 5, s. 519-522, ISSN: 20499434.

[31] Fogarasi Erzsébet, Croitoru Mircea Dumitru, Fülöp Ibolya, Muntean Daniela-Lucia. Is the Oxidative Stress Really a Disease? *Acta Medica Marisiensis*. 2016, roč. 62, č. 1, s. 112-120, ISSN: 20683324.

[32] Wang, Xinglong, Wenzhang Wang, Li LI, George Perry, Hyoung-gon Lee a Xiongwei Zhu. Review: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *BBA - Molecular Basis of Disease*. 2014, roč. 1842, č. 8, s. 1240-1247, ISSN: 09254439.

[33] Campos C., Rocha N.B.F., Vieira R.T., Caixeta L., Rocha S.A., Telles-Correia D., Yuan T., Paes F., Nardi A.E., Machado S., Arias-Carrión O. Treatment of Cognitive Deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. *Psychiatria Danubina*. 2016, roč. 28, č. 1, s. 2-12, ISSN: 03535053.

[34] Prvulovic D., Schneiderab B. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of donepezil for the treatment of Alzheimer's disease. 2014 [online], [cit. 4.5.2016], s. 1039-

1050. Dostupné z:

<http://www.tandfonline.com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/full/10.1517/17425255.2014.915028>

[35] Zemek F., Drtinova L., Nepovimova E., Sepsova V., Korabecny J., Klimes J., KucaK. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2014, roč. 13, č. 6, s. 759-774, ISSN: 1474-0338.

[36] Chu LW. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong medical journal*. 2012, roč. 18, č. 3, s. 228-237, ISSN: 10242708.

[37] Herrmann, N., Chau, S. A., Kircanski, I., Lanctôt, K. L. Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Drugs*. 2014, roč. 71, č. 15, s. 2031-2065, ISSN: 00126667.

[38] Yu Pong Ng, Terry Cho Tsun Or, Nancy Y. Ip. Review: Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Nutraceuticals: Molecular and Functional Insights into how Natural Products Nourish the Brain*. *Neurochemistry International*. 2015, roč. 89, s. 260-270, ISSN: 0197-0186.

[39] Ferreira A., Rodrigues Márcio, Fortuna Ana, Falcão Amílcar, Alves Gilberto. Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology. *Phytochemistry Reviews*. 2016, roč. 15, č. 1, s. 51-85, ISSN: 15687767.

[40] Pohanka M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2012, roč. 22, č. 8, s. 871-886, ISSN: 1354-3776.

[41] Prentice H., Modi JP., Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015, s. 964518-964518, ISSN 19420900.

[42] Cesare Mancuso, Raffaella Siciliano, Eugenio Barone, David Allan Butterfield, Paolo Preziosi. Pharmacologists and Alzheimer disease therapy: to boldly go where no scientist has

gone before. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2011, roč. 20, č. 9, s. 1243-1261, ISSN: 1354-3784.

[43] Hosák L., Hrdlička M., Libiger J. *Psychiatrie a pedopsychiatrie (1)*, Charles University in Prague, Karolinum Press. 2015, s. 647, ISBN: 9788024629988.

[44] Campos C., Rocha NB., Vieira RT., Rocha SA., Telles-Correia D., Paes F., Yuan T., Nardi AE., Arias-Carrión O., Machado S., Caixeta L. Treatment of Cognitive Deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. *Psychiatria Danubina*. 2016, roč. 28, č. 1, s. 2-12, ISSN: 03535053.

[45] Guntupalli, Sumasri, Jocelyn Widagdo, Victor Anggono. "Amyloid- $\beta$ -Induced Dysregulation of AMPA Receptor Trafficking." *Neural Plasticity*. 2016, s. 3204519, ISBN: 2090-5904.

[46] Lewerenz J., Pamela Maher. "Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What Is the Evidence?" *Frontiers in Neuroscience*. 2015, roč. 9, s. 469. ISSN: 1662-4548.

[47] Ángel Chamorro, Ulrich Dirnagl, Xabier Urra, Anna M Planas. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*. 2016, roč. 15, č. 8, s. 869-881, ISSN: 1474-4422.

[48] Zhou X, Li Y, Shi X, Ma C. An overview on therapeutics attenuating amyloid  $\beta$  level in Alzheimer's disease: targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels. *American Journal of Translational Research*. 2016, roč. 8, č. 2, s. 246-269, ISSN: 1943-8141.

[49] Fernández Calvo B., Contador Israel, Ramos Francisco, Olazarán Javier, Mograbi Daniel C., Morris Robin G. Effect of unawareness on rehabilitation outcome in a randomised controlled trial of multicomponent intervention for patients with mild Alzheimer's disease. *Neuropsychological Rehabilitation*. 2015, roč. 25, č. 3, s. 448-477, ISSN: 09602011.

- [50] Roca María, Gleichgerrcht Ezequiel, Torralva Teresa, Manes Facundo. Cognitive rehabilitation in posterior cortical atrophy. *Neuropsychological Rehabilitation*. 2010, roč. 20, č. 4, s. 528-540, ISSN: 09602011.
- [51] Winslow Bradford T., Onysko Mary K., Stob Christian M., Hazlewood Kathleen A. Treatment of Alzheimer Disease. *American Family Physician*. 2011, roč. 83, č. 12, s. 1403-1412, ISSN: 0002838X.
- [52] Wojtunik-Kulesza KA., Oniszczyk A., Oniszczyk T., Waksmundzka-Hajnos M. Review: The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2016, roč. 78, s. 39-49, ISSN: 07533322.
- [53] SHI Chun, Jun Liu, Fengming Wu, Yew David T. Ginkgo biloba Extract in Alzheimer's Disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. *International journal of molecular sciences*. 2010, roč. 11, č. 1, s. 107-123, ISSN: 16616596.
- [54] Malykh A., Sadaie MR. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs*. 2010, roč. 70, č. 3, s. 287-312, ISSN: 00126667.
- [55] Doležal M., Kučerová M., Miletín M., Musílek K., Opletalová V., Zimčík P. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém, Karolinum. 2013, s. 183, ISBN: 978-80-246-2382-5.
- [56] Chang WH., Park CH., Kim DY., Shin YI. Ko MH., Lee A., Jang SY., Kim YH. Cerebrolysin combined with rehabilitation promotes motor recovery in patients with severe motor impairment after stroke. *BMC Neurology*. 2016, roč. 16, s. 1-11, ISSN: 14712377.
- [57] GAauthier Serge, Proaño Jefferson Voltaire, Jia Jianping, Froelich Lutz, Vester Johannes Christophe, Doppler Edith. Cerebrolysin in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2015, roč. 39, č. 5-6, s. 332-347, ISSN: 14208008.

[58] Tayeb Haythum O., Yang Hyun Duk, Price Bruce H., Tarazi Frank I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*. 2012, roč. 134, č. 1, s. 8-25, ISSN: 01637258.

[59] Anand R., Gill KD., Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014, roč. 76 Pt A, s. 27-50, ISSN: 00283908.

[60] Kalra J., Khan A. Review: Reducing A $\beta$  load and tau phosphorylation: Emerging perspective for treating Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*. 2015, roč. 764, s. 571-581, ISSN: 0014-2999.

[61] Jahodář L., *Farmakobotanika–semenné rostliny*, Karolinum 2009, ISBN: 978-80-246-1791-6.

[62] Leifertová I., Baloun J. *Farmaceutická botanika systematika*, Státní pedagogické nakladatelství, 1990, str. 174, str. 151.

[63] Rønsted Nina, Symonds Matthew R.E., Birkholm Trine, Christensen Søren Brøgger, Meerow Alan W., Molander Marianne, Mølgaard Per, Petersen Gitte, Rasmussen Nina, van Staden Johannes, Stafford Gary I., Jäger Anna K. Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of Amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology*. 2012, roč. 12, č. 1, s. 182-193, ISSN: 14712148.

[64] Dalecká M. , Havelka M., Královec K. , Brůčková L. a Cahlíková L. Univerzita Pardubice. přijato 9.8.13. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* 107, 2013, s. 701–708. Referát 701.

[65] Jaume Bastida, Strahil Berkov, Laura Torras, Natalia Belén Pigni, Jean Paulo de Andrade, Vanessa Martínez, Carles Codina and Francesc Viladomat. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2011, s. 65-100, ISBN: 978-81-7895-528-5.

[66] López Susana, Bastida Jaume, Viladomat Francesc, Codina Carles. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. Life sciences. 2002, roč. 71, č. 21, s. 2521-2529, ISSN: 00243205.

[67] Řezanka T., Řezanka P., Sigler K. Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from Narcissus having axial chirality. Phytochemistry. 2010, roč. 71, č. 2-3, s. 301-306, ISSN: 00319422.

[68] Adam M. Takos, Fred Rook. Review: Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. International Journal of Molecular Sciences. 2013, roč. 14, č. 6, s. 11713-11741, ISSN: 1422-0067.

[69] Evidente A., Kornienko A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. Phytochemistry Reviews. 2009, roč. 8, č. 2, s. 449, ISSN: 15687767.

[70] Attar-ur-Rahman. Studies in Natural Products Chemistry: Structure and Chemistry (Part F), Elsevier. 1998, str. 1364, (323-324)

[71] Narcissu 'Dutch Master' daffodil 'Dutch Master'. Royal Horticultural society. [online], [20. 5. 2016] <https://www.rhs.org.uk/plants/details?plantid=5221>

[72] Li X, Lu M, Tang D, Shi Y. Composition of Carotenoids and Flavonoids in Narcissus Cultivars and their Relationship with Flower Color. 2015, roč. 10, č. 11, s. 1-14, ISSN: 1932-6203.

[73] Řezanka T., Řezanka P., Sigler K. Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from Narcissus having axial chirality. Phytochemistry. 2010, roč. 71, č. 2-3, s. 301-306, ISSN: 00319422.



[74] Buket Bozkur Sarikaya, Nehir Unver Somer, Gulen Irem Kaya, Mustafa Ali Onur, Jaume Bastida, Stahil Berkov. GC-MS Investigation and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of *Galanthus rhizensis*. 2013, roč. 68, č. 3-4, s. 118-24, ISSN: 0939-5075.

[75] Abou-Donia Amina H., Darwish Fikria A., Amer Masouda E., Kassem Fahima F., Hammada, Hala M., Shin, Young-Geun. Alkaloids from *Narcissus cv. Ice Follies* cultivated in Egypt. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, roč. 16, č. 2, s.96-99. Database: CAPLUS

[76] Elisha I.L., Elgorashi E.E., Hussein A.A., Duncan G., Eloff J.N. Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bulb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine. *South African journal of botany*. 2013, roč. 85, s. 44-47, ISSN: 02546299.

[77] Wang YH., Wan QL., Gu CD., Luo HR., Long CL. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal*. 2012, roč. 6, č.1, ISSN: 1752153X.