

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Screening biologické aktivity různých druhů rodu *Narcissus* sp. III

Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus* sp. III

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Daniela Suchánková, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2023

Zuzana Růžičková

Čestné prohlášení

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 662.

Tímto prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem a je vypracována pod odborným dohledem a vedením PharmDr. Daniely Suchánkové, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, květen 2023

Zuzana Růžičková

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucí své diplomové práce PharmDr. Daniele Suchánkové Ph.D. za její čas, poskytnuté rady, materiály a trpělivost. Velké poděkování patří také katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky za poskytnuté zázemí, přístrojové vybavení, informační zdroje a veškerou pomoc. V neposlední řadě bych moc ráda poděkovala celé svojí rodině, přátelům a zejména partnerovi, který byl mou velikou oporou během celého studia a také při psaní této diplomové práce.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	3
3	Čeleď Amaryllidaceae.....	4
3.1	Rod <i>Narcissus</i>	5
3.2	Kultivary rodu <i>Narcissus</i> použité v experimentální části	8
3.2.1	<i>Narcissus</i> cv. Banana Splash.....	8
3.2.2	<i>Narcissus</i> cv. Gentle Giant.....	9
3.2.3	<i>Narcissus</i> cv. Las Vegas	9
3.2.4	<i>Narcissus</i> cv. Lemon Beauty	10
3.2.5	<i>Narcissus</i> cv. Mary G. Lirette.....	10
3.2.6	<i>Narcissus</i> cv. Orange Progress	11
3.2.7	<i>Narcissus</i> cv. Pink Wonder	11
3.3	Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae.....	12
3.3.1	Lykorinový strukturní typ	13
3.3.2	Haemanthaminový a krinanový strukturní typ	14
3.3.3	Pankratistatinový strukturní typ	19
3.3.4	Homolykorinový strukturní typ	20
3.3.5	Tazettinový strukturní typ.....	21
3.3.6	Galantaminový strukturní typ	22
3.3.7	Montaninový strukturní typ	22
3.4	Alzheimerova nemoc.....	23
3.4.1	Epidemiologie.....	23
3.4.2	Etiopatogeneze	24
3.4.3	Klinický obraz	27
3.4.4	Diagnostika.....	28
3.4.5	Terapie	29
3.4.6	Farmakologická léčba.....	29
3.4.7	Doplňková léčba	34
3.4.8	Nefarmakologická léčba	36
3.4.9	Výzkum a hledání nových molekul vhodných k terapii AN	36
4	Experimentální část.....	40

4.1	Všeobecné postupy.....	40
4.1.1	Destilace.....	40
4.2	Chemikálie, rozpouštědla, činidla, přístrojové vybavení, rostlinný materiál.....	40
4.2.1	Chemikálie, rozpouštědla, činidla.....	40
4.2.2	Přístrojové vybavení.....	41
4.2.3	Databáze.....	41
4.2.4	Rostlinný materiál.....	41
4.3	Popis provedených experimentů.....	42
4.3.1	Příprava alkaloidních extraktů.....	42
4.3.2	Identifikace alkaloidů pomocí GC-MS analýzy.....	44
4.3.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE.....	44
4.3.4	Stanovení inhibiční aktivity.....	45
4.3.5	Separace alkaloidů kultivaru AL-735 (MARY G. LIRETTE).....	46
5	Výsledky.....	50
5.1	Chromatogramy jednotlivých sumárních extraktů.....	50
5.2	Zastoupení alkaloidů v jednotlivých kultivarech.....	57
5.3	Inhibiční aktivita jednotlivých alkaloidních extraktů vůči AChE, BuChE.....	57
5.4	Alkaloidy izolované z kultivaru AL-735 - <i>Narcissus</i> cv. Mary G. Lirette.....	58
6	Diskuze a závěr.....	63
7	Abstrakt.....	66
8	Abstract.....	67
9	Seznam použité literatury.....	68

Seznam zkratek

- A β = β -amyloid
- ABAD = 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 10
- AChE = acetylcholinesterasa
- AMK = aminokyselina
- AN = Alzheimerova nemoc
- ApoE4 = Apolipoprotein E4
- APP = amyloidový prekurzorový protein
- A549 = nemalobuněčný plicní karcinom
- BACE = β -sekretasa
- BuChE = butyrylcholinesterasa
- CDK = cyklin-dependetní kináza
- CDT = Clock Drawing test
- CEM = buňky akutní lymfoblastické leukémie
- CNS = centrální nervový systém
- GSK3- β = glykogen syntáza kináza
- GS/MS = plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
- HeLa = karcinom děložního hrdla
- HepG2 = jaterní karcinom
- iAChE = inhibitor acetylcholinesterasy
- iBuChE = inhibitor butyrylcholinesterasy
- IC₅₀ = 50% inhibiční koncentrace
- K562 = buňky chronická myeloidní leukémie
- MAPs = microtubule-associated proteins
- MCF7 = buňky rakoviny prsu
- Mcl-1 = myeloidní buněčné leukémie-1
- MF = mobilní fáze
- MMSE = mini mental status examination

- MoCA = Montrealský kognitivní test
- MOLT-4 = buňky akutní lymfoblastické leukémie
- NFTs = neurofibrilární tangles
- NMDA = *N*-methyl-*D*-aspartátová kyselina
- SORL1 = sortilin-related receptor
- TLC = tenkovrstvá chromatografie

1 Úvod

Předmětem mnoha výzkumných skupin je snaha objevit nová kvalitní, bezpečná a účinná léčiva. Inspirace bývá nalézána také mezi přírodními zdroji. Až 80 % účinných látek, obsažených v registrovaných léčivech uplatněných v protirakovinné terapii v letech 1981 až 2010, pocházelo z přírodních zdrojů.¹ Pozornost je soustředěna i na čeleď Amaryllidaceae, která představuje velmi bohatý zdroj chemických molekul. Tato velká čeleď jednoděložných cibulovitých kvetoucích bylin obsahuje přibližně tisíc druhů rostlin, vyskytujících se zejména v teplejších oblastech světa. Některé z těchto druhů jsou pouze okrasné, jiné mohou být využity i k terapeutickým účelům, ke kterým se využívají již od 4. století před naším letopočtem, kdy byl olej z narcisu aplikován k léčbě nádoru dělohy Hippocratem z Cosu.^{2, 3, 4, 5} Protinádorových účinků využíval také Plinius starší v 1. století našeho letopočtu a ve středověku extrakty z rostlin čeledi Amaryllidaceae našly uplatnění v severní Africe, Číně a Arábii.¹ Čeleď je významná zejména pro obsah amaryllidových alkaloidů, které můžeme podle hlavní struktury dělit do několika skupin: lykorinová, homolykorinová, krininová, haemanthaminová, tazettinová, montaninová, narciklasinová, galantaminová a norbelladinová. Alkaloidy disponují spoustou zajímavých biologických aktivit např. cytotoxickou, antimalarickou, antivirovou, antidepressivní, antikonvulzivní, antibakteriální, antimykotickou, analgetickou a některé z nich působí jako inhibitory acetylcholinesterasy (iAChE), kterým se tato diplomová práce věnuje v největší míře.^{1, 2, 6}

Symptomaticky působící iAChE řadíme mezi základní farmakoterapii Alzheimerovy nemoci. Alzheimerova nemoc je závažné onemocnění, pro které je charakteristická postupná degenerace neuronů a mozkové tkáně. Alzheimerova nemoc (AN) je jednou z nejčastějších příčin demence a úmrtí. Demence tvoří jednu z nejobvyklejších chorob ve stáří. Do budoucna nelze předpokládat příznivý vývoj situace ohledně množství nemocných s touto diagnózou. Důvodem je demografický vývoj spojený s postupným stárnutím obyvatelstva.⁷ Je proto velmi důležité, pokusit se nalézt nová léčiva právě v této oblasti.

Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na přípravě sumárních alkaloidních extraktů z cibulí 7 kultivarů rodu *Narcissus* sp., následném vyhodnocení těchto získaných extraktů pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS),

stanovení inhibiční aktivity vůči acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE),
izolaci alkaloidů z vybraného kultivaru – konkrétně *Narcissus* cv. Mary G. Lirette.

2 Cíl práce

- Připravit sumární alkaloidní extrakty z cibulí 7 kultivarů rodu *Narcissus* sp. – *Narcissus* cv. Banana Splash, *Narcissus* cv. Gentle Giant, *Narcissus* cv. Las Vegas, *Narcissus* cv. Lemon Beauty, *Narcissus* cv. Mary G. Lirette, *Narcissus* cv. Orange Progress a *Narcissus* cv. Pink Wonder
- Vyhodnotit alkaloidní složení těchto extraktů pomocí GC-MS analýzy
- Stanovit inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase
- Navrhnout vhodné kultivary narcisů pro další fytochemické studie a následnou izolaci potenciálně účinných látek pro terapii Alzheimerovy choroby
- Izolovat alkaloidy zvoleného kultivaru za využití preparativní TLC a následně analyzovat získané čisté látky pomocí fyzikálně-chemických metod
- Provést literární rešerši na téma *Narcissus* se zaměřením na Alzheimerovu chorobu a sepsat teoretickou část diplomové práce ze získaných dat a informací

3 Čeleď Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae (Amarylkovité) je odborně řazena do řádu Amaryllidales. Do této čeledi vytrvalých bylin dále spadají např. rostliny rodu *Leucojum*, *Galanthus*, *Crinum*, *Amaryllis*, *Clivia* a *Narcissus*.

Tab. č. 1 – Přehled čeledí řazených do řádu Amaryllidales³

Amaryllidales

Hyacinthaceae

Alliaceae

Agavaceae

Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae, která nese název podle rodu *Amaryllis*², obsahuje přes 1100 druhů rostlin, které spadají do více než 85 rodů.⁴ Rostliny této čeledi lze zařadit mezi jednoděložné byliny, jejichž struktura je tvořena oddenkou či cibulemi, oboupohlavnými květy se spodním semeníkem a plody tobolkou či bobulí. Pro čeleď Amaryllidaceae platí uvedený květní vzorec:³

$\text{♂} * \text{slabě} \downarrow \text{P3} + 3 \text{ n. (3+3) A3} + 3 \overline{\text{G(3)}}$

Rostlinám čeledi Amaryllidaceae se daří růst zejména v teplejších až tropických částech světa, hojně se nacházejí např. v severní Africe a Asii. S mnoha druhy se lze potkat i na území Evropy, převážně ve Středomořské oblasti.⁵

Čeleď Amaryllidaceae tvoří významnou část rostlinstva, obsahující bohaté množství chemických molekul a které jsou věnovány rozsáhlé výzkumy a studie. Snahou těchto výzkumů je objevit nová potenciální léčiva pomocí fytochemických prací a zjistit funkce a mechanismy účinků na fytochemické bázi a zjistit jejich funkce a mechanismy. Čeleď je unikátní především pro obsah látek alkaloidní povahy tzv. amarylkovitých alkaloidů s velmi širokým spektrem biologických aktivit např. cytotoxická, antimalarická, antivirová, antidepressivní, antikonvulzivní, antibakteriální, antimykotická, analgetická a některé z nich působí jako iAChE, kterým je tato diplomová práce nejvíce věnována.^{1,2} Mezi amarylkovité alkaloidy patří např. lykorin, který

je významný převážně pro své specifické selektivní protirakovinné vlastnosti nebo galantamin, který je nedílnou součástí farmakoterapie využívané při léčbě AN. Alkaloid galantamin se dříve získával izolací z rostlin čeledi Amaryllidaceae, v dnešní době je i syntetizován v chemických laboratořích.^{2,3,6,7}

3.1 Rod *Narcissus*

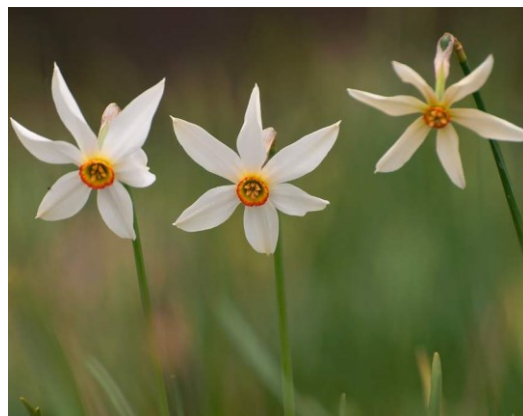
Rostliny z rodu *Narcissus* patří do čeledi Amaryllidaceae (Amarylkovité). Narcisy jsou běžně pěstovanými vytrvalými rostlinami, kterým se daří téměř po celém světě. Kolem 50–70 druhů původních druhů a mnoho vyšlechtěných kultivarů lze najít na území Evropy, kde se nacházejí především v jejich jižních částech a poměrnou část také v severní Africe. Jednoznačný popis narcisů není snadný, kvůli lehkosti hybridizace, kultivace a šlechtění. Vyskytují se převážně na pastvinách, v křovinách, lesích nebo říčních březích a často zplaňují. Všechny druhy jsou pro člověka jedovaté. Vůně bývá jemná až intenzivní. V České republice ve volné přírodě lze najít *Narcissus poeticus* a *Narcissus pseudonarcissus*, v Evropě je nejrozšířenějším druhem *Narcissus tazetta*.^{3,8,9,10,11}

Rostliny tohoto rodu vyžadují ke správnému prosperování chladnější polohy s dostatkem slunečního záření (minimálně polostín) a dostatečné množství srážek. Preferují suché léto. Narcisy jsou choulostivé na kolísání teploty, proto je ideální vysadit je alespoň 12–15 cm pod povrch země a zároveň na podzim s teplotou půdy pod 12 °C. Půda by měla mít vyšší propustnost, neutrální pH a dostatek živin.^{8,9} Kořeny narcisu jsou nevětvené a mají výraznou kořenovou čepičku.¹¹ Cibule, které jsou uzavřeny v šupinatém obalu okrové až hnědé barvy, mají rozmanitou velikost mezi 6 mm a 10 cm. Jedná se o víceleté cibule, stáří lze snadno rozpoznat podle počtu suknic, kterými je cibule tvořena. Čárkovité či řemínkovité listy se nedoporučuje odřezávat a svazovat, dokud úplně neseschnou. Do této chvíle totiž vytvářejí živiny, které jsou velmi důležité pro růst rostliny v dalších letech a rostlina tak může lépe prosperovat.^{8,9}

Většina narcisů kvete na jaře, květy jsou zdobné, nejčastěji bílé či žluté barvy a bývají převislé.^{8,9} Mezi druhy kvetoucí výjimečně na podzim patří *Narcissus elegans*, *Narcissus serotinus*, *Narcissus viridiflorus* a *Narcissus humilis*, které se v zahradnictví příliš nevyužívají kvůli svým drobným a nevýrazným květům.¹¹



Obr. č. 1 – *Narcissus viridiflorus*¹²



Obr. č. 2 – *Narcissus serotinus*¹³

Květy jsou trojčetné, tvoří je šest okvětních lístků rozdělených do dvou přeslenů, které jsou na bázi spojeny v širokou trubku, v jejímž ústí roste do široka vyčnívající pakorunka mnoha různých velikostí, tvarů i barev. Charakter pakorunky je hlavním faktorem pro rozlišení jednotlivých druhů a kultivarů narcisů.

Narcisy se v minulosti rozdělovaly do několika skupin a podskupin. Podskupiny byly později zrušeny, hlavním kritériem pro zařazení do skupiny se stal tvar pakorunky, dále pak její zbarvení a převládající barva narcisu. Narcisy můžeme zařadit celkem do 12 základních skupin.^{8,9}

Tab. č. 2 – Rozdělení narcisů do jednotlivých skupin^{8,9}

SKUPINA	HLAVNÍ ZNAKY	ZÁSTUPCE
trubkovité	<ul style="list-style-type: none"> • 1 květ • pakorunka/trubka stejně dlouhá nebo delší než okvětní plátky 	<i>Narcissus</i> cv. King Alfred
krátkokorunné	<ul style="list-style-type: none"> • 1 květ • pakorunka kratší než 1/3 vnějších okvětních plátků 	<i>Narcissus</i> cv. Firetail ¹⁴
plnokvěté	<ul style="list-style-type: none"> • okvětní plátky ve vyšším počtu • trubku od pakorunky nelze odlišit 	<i>Narcissus</i> cv. Erlicheer

SKUPINA	HLAVNÍ ZNAKY	ZÁSTUPCE
<i>triandrus</i> hybridy	<ul style="list-style-type: none"> • 1–6 květů • krátký stonek • okvětní lístky mají opačný charakter 	<i>Narcissus</i> cv. Hawera
s členěnou pakorunkou	<ul style="list-style-type: none"> • 1 květ • rozdělená pakorunka • okvětní plátky jsou v 1 kruhu po šesti 	<i>Narcissus</i> cv. Dolly Mollinger
<i>tazetta</i>	<ul style="list-style-type: none"> • drobné květy • velké množství květů (až 20) • pozdní kvetení • silná vůně 	<i>Narcissus</i> cv. Avalanche
<i>cyclamineus</i> hybridy	<ul style="list-style-type: none"> • středně vysoké • ohnutá trubka • časně kvetení 	<i>Narcissus</i> cv. Garden princess
s velkou pakorunkou	<ul style="list-style-type: none"> • trubka/pakorunka delší než 1/3 délky okvětních lístků 	<i>Narcissus</i> cv. Carlton
s malou pakorunkou	<ul style="list-style-type: none"> • pakorunka kratší než 1/3 délky okvětních lístků 	<i>Narcissus</i> cv. Aflame
<i>jonquilla</i>	<ul style="list-style-type: none"> • vyšší počet květů • hladká pakorunka • silná vůně 	<i>Narcissus</i> cv. Baby Moon
<i>poeticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • malá pakorunka ve tvaru misky • příjemná vůně 	<i>Narcissus</i> cv. Actaea
původní druhy		<i>Narcissus bulbocodium conspicuus</i>



Obr. č. 3 – Narcis s členěnou pakorunkou¹⁵, narcis ze skupiny *jonquilla*¹⁶, narcis ze skupiny *poeticus*¹⁷

Uvnitř květu se nachází 6 tyčinek okolo pestíku s bliznou kulatého nebo trojklanného tvaru.^{8,9}

Termín kvetení narcisů se odvíjí od jarních teplot, které musí být dostatečně vysoké. Poupátko je uzavřené v ochranném toulci zelené barvy, který po rozkvetení rychle usychá.^{9,11} Mezi nejdéle kvetoucí narcisy patří kultivary ze skupiny *tazetta* a *bulbocodium*.⁸ Plodem je vejčitá trojpouzdrá tobolka, která dorůstá plné velikosti ve 2 týdnech. Semena jsou černá a mají kulatý tvar.^{9,11}

3.2 Kultivary rodu *Narcissus* použité v experimentální části

V experimentální části diplomové práce byly použity cibule jednotlivých kultivarů rodu *Narcissus* sp., konkrétně *Narcissus* cv. Banana Splash, *Narcissus* cv. Gentle Giant, *Narcissus* cv. Las Vegas, *Narcissus* cv. Lemon Beauty, *Narcissus* cv. Mary G. Lirette, *Narcissus* cv. Orange Progress a *Narcissus* cv. Pink Wonder.

3.2.1 *Narcissus* cv. Banana Splash

Kultivar *Narcissus* Banana Splash je trvalkou vyznačující se výrazným žlutobílým květem, který je složen z bílých okvětních lístků a ozdobně zvlněného členitého žlutého šálku. Narcis dosahuje výšky až kolem 50 cm, pupeny a následně květy se objevují na jaře během dubna. Stonek zdobí tmavě zelené, úzké, vzpřímené kopinaté listy. Cibule tohoto narcisu se doporučuje vysadit jako obvykle koncem léta nebo začátkem podzimu. Na půdu je nenáročný, nemá žádné speciální požadavky. Preferuje však mírně kyselé nebo neutrální pH substrátu a přímé slunce. Hybridizátorem je Carlos van der Veek a původem je z Nizozemska.^{18,19,20}



Obr. č. 4 – *Narcissus* cv. Banana Splash¹⁸

3.2.2 *Narcissus* cv. Gentle Giant

Tato odrůda narcisu je výjimečná svými dvoubarevnými květy, které se skládají z velkých bílých okvětních lístků a výrazné červenooranžové pakorunky ve tvaru trubky. Pupeny a následně květy se začínají objevovat na jaře v dubnu a kvetení může trvat až do konce května. Jedná se o trvalku. Velikost rostliny bývá mezi 32,5 a 67,5 cm. Narcis je vhodné umístit na slunné, případně polostinné místo. Pro rostlinu není vhodná příliš zavodněná půda. Hybridizátorem je J.W.A. Lefeber, původem je také z Nizozemska. Byl registrován v roce 1995.^{21,22}



Obr. č. 5 – *Narcissus* cv. Gentle Giant²¹

3.2.3 *Narcissus* cv. Las Vegas

Narcissus Las Vegas je kultivarem pocházejícím z Nizozemska, kde byl hybridizován D. van Buggenumem. V roce 1981 byl registrován a v roce 2019 mu byla udělena americkou společností narcisů cena Wister Award. Jeho mohutný květ se skládá ze slonovinově bílých okvětních lístků a výrazné sytě žluté trubky se zvlněným okrajem. Při vhodných podmínkách dosahuje rostlina nejčastěji výšky mezi 30 a 67 cm. Není náročná na pěstování, oceňuje však přímé slunce či polostín.^{23,24,25}



Obr. č. 6 – *Narcissus* cv. Las Vegas²³

3.2.4 *Narcissus* cv. Lemon Beauty

Kultivar *Narcissus* Lemon Beauty je původem z Nizozemska a byl poprvé pěstován v roce 1948, kdy byl hybridizován J. W. A. Lefeberem. Registraci obdržel v roce 1962 a ve stejném roce získal také ocenění AM Haarlem Award. Pro tento Narcis jsou typické slonovinově bílé květy se žlutým středem ve tvaru hvězdy. Rostlina obvykle dorůstá výšky mezi 32,5 a 67,5 cm. Cibule je vhodné zasadit během podzimu na slunné místo, alespoň 10 cm hluboko do úrodné, dobře odvodněné půdy. Pro víceleté pěstování se doporučuje cibule nechat přes zimu v zemi, nejlépe pod stromy či v trávě. Pokud bychom chtěli cibule přemístit, měly by se ze země vyndat až po odumření všech listů.^{26, 27, 28}



Obr. č. 7 – *Narcissus* cv. Lemon Beauty²⁶

3.2.5 *Narcissus* cv. Mary G. Lirette

Narcissus Mary G. Lirette byl registrován W. van Lierop and Sons v roce 2013. Tato sladce vonící odrůda je původem z Nizozemska a za hybridizéra je považován Jack Gerritsen. Standardně vyrůstá do výšky mezi 32,5 a 67,5 cm. Svůj název zdělila po profesionální pianistce. Květy tohoto kultivaru jsou tvořeny bílými okvětními lístky a kolárem, který je při rozkvétání žluté barvy, která rychle přechází do lososovomeruňkové. Pro správné kvetení rostliny v dalších

sezónách se také doporučuje odřezávat listy až po jejich zežloutnutí. Pro pěstování této rostliny je ideální dobře propustná, odvodněná půda s dostatkem slunečního světla, které je důležité mimo jiné i pro tvorbu květů v dalších letech života rostliny. Cibule je nutné zasadit během podzimních měsíců, aby stihly ještě před začátkem zimy zakořenit.^{29,30,31}



Obr. č. 8 – *Narcissus* cv. Mary G. Lirette²⁹

3.2.6 *Narcissus* cv. Orange Progress

Kultivar *Narcissus* Orange Progress standardně dorůstá výšky mezi 32,5 a 67,5 cm. Doba kvetení je dlouhá. Květy se začínají objevovat během dubna a jsou tvořeny zlatožlutými okvětními lístky, které se překrývají z 1/3 až 1/2 a mohutným nařaseným oranžovým šálkem s výrazně drobně vlněným nepravidelným okrajem. Pro úspěšné pěstování je důležitý správný výběr místa pro zasazení cibulí, které by mělo být na přímém slunci, případně v polostínu. Tento Narcis, který je původem z Nizozemska, je registrován od roku 1968. Hybridizérem je J. W. A. Lefeber, stejně jako u kultivaru *N. Lemon Beauty*.^{32,33}



Obr. č. 9 – *Narcissus* cv. Orange Progress³²

3.2.7 *Narcissus* cv. Pink Wonder

Narcissus Pink Wonder je původem z Nizozemska a za hybridizéra je považován J. Gerritsen and Son. Byl registrován v roce 2006 v Nizozemsku W. van Lierop and Sons. Standardně dorůstá výšky mezi 32,5 a 67,5 cm. Pro tento kultivar jsou typické okvětní lístky slonovinově

bílé barvy, které se překrývají z poloviny i více a jsou překryté lososovými jemně našasenými lístky. Uprostřed květu se nacházejí žluté prašníky. Rostlina začíná kvést během dubna. Listy se doporučuje odstraňovat až po jejich zežloutnutí, aby bylo podpořeno kvetení v dalších letech života rostliny. Rostlina by měla být pěstována v dobře propustné půdě a v oblastech s dostatkem slunečního záření, které by ale mělo být ideálně filtrováno, aby z květů nevybledla růžová barva. Hnojení je doporučováno minimálně 3x do roka.^{34, 35, 36}



Obr. č. 10 – *Narcissus* cv. Pink Wonder³⁴

3.3 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

Nejvýznamnějšími obsahovými látkami rostlin čeledi Amaryllidaceae jsou amaryllitové alkaloidy, patřící do objemné skupiny isochinolinových alkaloidů.³⁷ Těchto sekundárních metabolitů, lišících se navzájem svou strukturou, je v současné době známo více než 500. Jedná se o polycyklické sloučeniny s obsahem dusíku v molekule, které můžeme podle hlavní struktury rozřazovat do několika typů, hlavními jsou lykorinový, homolykorinový, krininový, haemanthaminový, tazettinový, montaninový, narciklasinový, galantaminový a norbelladinový.^{1, 38, 39} Skupiny jsou pojmenovány vždy podle hlavního představitele. Přestože jsou od sebe alkaloidy strukturně odlišné, pochází každý z nich ze společného prekurzoru norbelladinu. Dalším znakem, který spojuje alkaloidy z této čeledi, je kruhový systém složený z jednotky odvozené z fenylalaninu a jednotky odvozené od tyrosinu. V tradiční medicíně se uplatňují již velmi dlouho. Již ve 4. století před naším letopočtem byl olej z *Narcissus poeticus* použit Hippocratem z Cosu k léčbě nádorů dělohy. Studie několikrát prokázaly nadějnou protinádorovou, antiproliferativní, apoptózu indukující aktivitu. Izolace prvního alkaloidu, kterým byl lykorin, proběhla v roce 1877. Lykorin a jeho deriváty ukazují potenciál v léčbě rakoviny, virových onemocnění a AN. Je prokázáno, že lykorin zastavuje buněčný cyklus a vyvolává apoptózu v nádorové buněčné linii lidské leukémie (HL-60). β -krinanové alkaloidy

hemanthamin a hemanthidin působí protirakovinnými účinky též. Nejznámější alkaloid čeledi je galantamin, který zaujímá velmi silnou pozici na trhu léčiv pro terapii AN jako iAChE.^{1, 2, 38, 40}

V následujícím přehledu jsou uvedeny jednotlivé strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a vybraní zástupci.

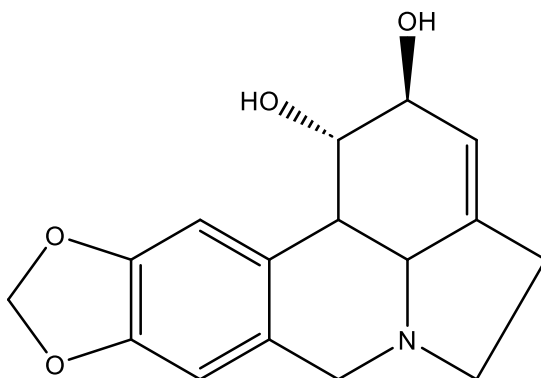
3.3.1 Lykorinový strukturní typ

Alkaloidy lykorinového strukturního typu mají ve své struktuře obsažen pyrrolo[d,e]fenanthridin.² Do této široké skupiny alkaloidů lze zařadit např. nejvíce známý lykorin, dále pseudolykorin, galanthin, amarbellisin, karanin nebo anhydrolykorin.⁴¹ Lykorin byl prvním alkaloidem izolovaným z čeledi Amaryllidaceae. Ceněn je zejména pro své selektivní protinádorové, antiproliferační schopnosti proti velkému množství multirezistentních a na apoptózu rezistentních buněk.⁴² Protinádorové účinky lykorinu jsou zkoumány již od roku 1920, kdy se tomuto alkaloidu intenzivně věnovali vědci z National Cancer Institute. Lykorin pravděpodobně působí také neuroprotektivně při negativním excitotoxickém působení glutamátu, který se např. při AN vyskytuje v mozkové tkáni v nadbytku. Tento alkaloid působí také proti virům a má protizánětlivé účinky. V Rusku je lykorin klinicky užíván pro své protizánětlivé účinky jako expektorans a pro léčbu onemocnění průdušek.¹ Lykorin vykazuje příznivé účinky proti RNA virům ze skupin *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* a japonské encefalitidy. Analogy lykorinu jsou sledovány z důvodu potencionální účinnosti na virus západního Nilu. Mechanismem účinku lykorinu během inhibičního působení skupinu *Flaviviridae* je potlačení syntézy RNA viru a současná inhibice translace proteinu. Lykorin potlačuje nežádoucí účinky koronaviru, konkrétně SARS-CoV, které se projevují těžkým respiračním syndromem. Nadějných výsledků lykorin dosahuje při schopnostech inhibovat poliovirus, lidský enterovirus 71 a rhabdomyosarkom.²

Protinádorová aktivita se objevuje u mnoha alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae,² výjimkou není ani lykorin. Snižuje množství proteinu myeloidní buněčné leukémie-1 – Mcl-1, jenž je přítomný ve vysokých koncentracích u nejrůznějších druhů rakoviny a v lidských leukemických buňkách. Vlastní účinek na apoptózu se skládá z regulace buněčného cyklu v nádorové buněčné linii lidské leukémie – HL-60 a buněčné linii KM3, aktivace kaspasy a uvolňování cytochromu-c. Nadějná koncentrace, naměřena při studiích na promyelocytární buněčné linii leukémie HL-60, se pohybuje mezi 0,31–5 μ M. Při koncentraci 5 μ M lykorin

zastavuje buněčný cyklus ve fázi G2/M.^{1, 42} Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou výjimečné zejména pro své specifické účinky proti rakovinotvorným buňkám rezistentním na apoptózu a dosavadní léčiva.²

Alkaloid lykorin působí z čeledi Amaryllidaceae nejsilnější antimalarickou aktivitou.² Malárie je závažné infekční onemocnění roznášené komárem a je přenosná mezi zvířaty i lidskou populací. Původcem této nemoci je organismus z rodu *Plasmodium*. Výskyt malárie je rozšířen po celém světě a stále stoupá z několika důvodů např. větší odolnost komárů, snižování účinnosti stávajících léčiv nebo nízká snaha vývoje léčiv nových.^{2,43} Zajímavá antimalarická aktivita byla zjištěna u derivátů odvozených ze struktury lykorinu. Aktivní deriváty obsahují volné hydroxylové skupiny na uhlíku C1 a C2 nebo jsou esterifikovány jako acetáty či isobutyryáty. Pro účinek je nezbytná přítomnost dvojnásobné vazby mezi uhlíky C2 a C3.² Lykorin účinkuje *in vitro* na antiplasmodiální aktivitu kmenů, které jsou citlivé na chlorochin i rezistentní na chlorochin.¹ Antiparazitární aktivita lykorinu spočívá v cytotoxickém působení na prvoka *Trichomonas vaginalis*, který infikuje urogenitální trakt a způsobuje vaginitidu u žen a uretritidu u mužů. Toto onemocnění je nejčastější sexuálně přenosná nemoc, která není způsobena virem. Nejsilnější antiparazitické aktivity bylo dosaženo s lykorinem, který byl esterifikovaný v poloze C2 lauroylovou skupinou.²

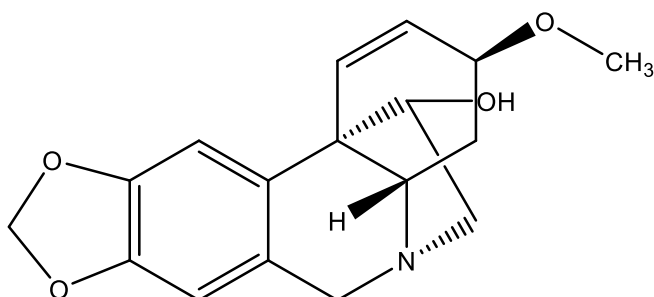


Obr. č. 11 – Lykorin

3.3.2 Haemanthaminový a krinanový strukturní typ

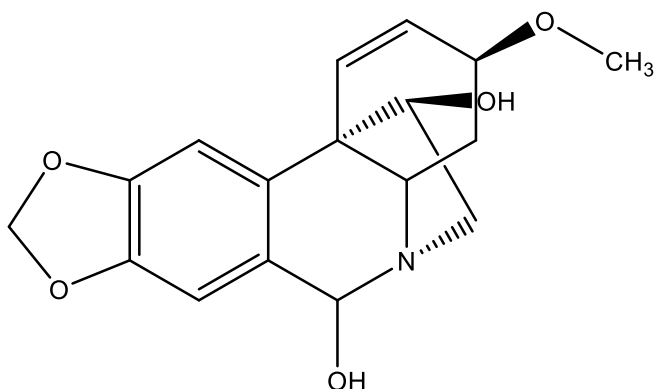
Alkaloidy těchto strukturních typů obsahují ve své struktuře 5,10- β -ethanofenanthridin.² Do této skupiny patří např. alkaloidy hemanthamin, hemanthidin, distichamin, bulbispermin, krinamin nebo maritidin.⁴¹ Hemanthamin je alkaloid β -krinanového typu¹, který působí vysokou cytotoxickou aktivitou *in vitro* proti rozmanitému množství rakovinných buněčných

linií, které zahrnují např. buňky karcinomu děložního hrdla (HeLa), akutní lymfoblastické leukémie – MOLT-4, jaterního karcinomu (HepG2), rakoviny prsu – MCF7, akutní lymfoblastické leukémie (CEM), chronické myeloidní leukémie (K562), nemalobuněčného plicního karcinomu (A549).^{1,44} Hemanthamin zároveň vlastní antioxidační účinky proti volným radikálům, je spolu s jeho semisyntetickými deriváty aktivní proti virům chřipky typu A a vykazuje antimalarickou aktivitu proti *Plasmodium falciparum* senzitivnímu na chlorochin, která je možná díky přítomnosti methylenedioxybenzenové části a terciálního dusíku bez navázaného methylu ve struktuře hemanthaminu.¹



Obr. č. 12 – Hemanthamin

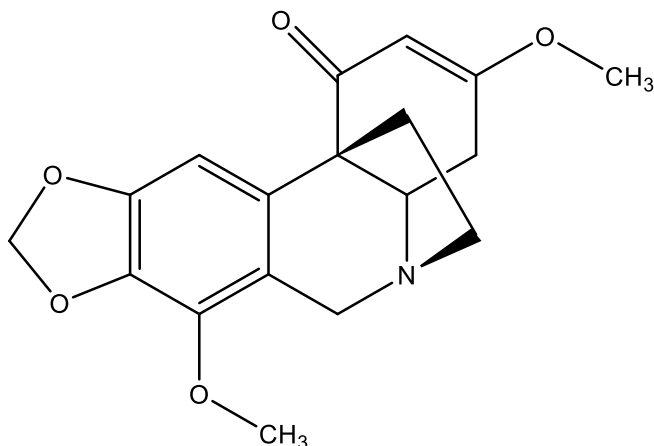
Dalším alkaloidem s cytotoxickými vlastnostmi je β -krinanový alkaloid haemanthidin, který se odvozuje od 5,10- β -ethanofenantridinu. Haemanthidin vykazuje slibné účinky proti A549, OE21 a rakovinotvorným buňkám Hs683 a SKMEL. Antimalarická aktivita Haemanthidinu je aktivní vůči prvokovi *Plasmodium falciparum* senzitivnímu na chlorochin a je zároveň účinná proti invazivním parazitům ze skupiny bičíkovců *Trypanosoma brucei rhodesiense* a *Trypanosoma cruzi*.¹



Obr. č. 13 – Hemanthidin

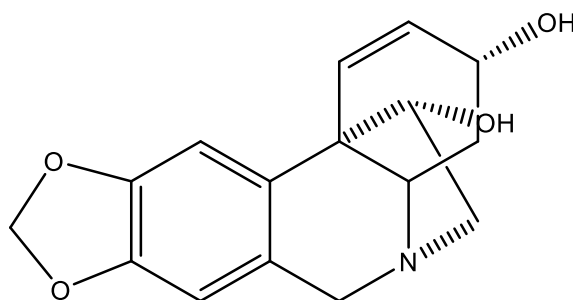
Distichamin je β -krinanový alkaloid, který se v čeledi Amaryllidaceae vyskytuje pouze v rostlině *Boophone disticha*. Distichamin působí silně na transportér serotoninu, působí

cytotoxickou aktivitou na lidské buněčné linie např. HeLa (nejcitlivější), CEM, K562, MCF-7 a G-361, narušuje buněčný cyklus a indukuje apoptózu v leukemických buňkách aktivací kaspasy 3 a 7.¹



Obr. č. 14 – Distichamin

Alkaloid bulbispermin byl poprvé izolován z rostliny *Crinum bulbispermum*. Studie uvádějí, že bulbispermin má silnou cytotoxickou aktivitu proti buňkám lidské leukémie HL-60.¹

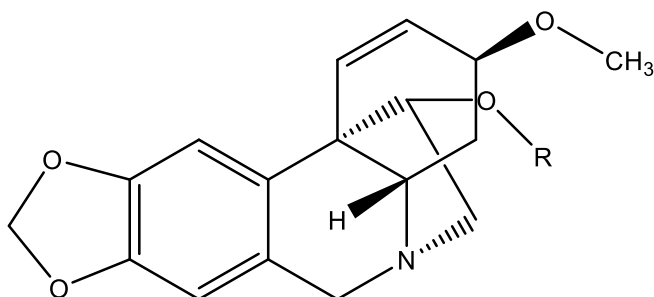


Obr. č. 15 – Bulbispermin

Některé aromatické estery odvozené ze struktury hemanthaminového typu, vykazují podle studií poměrně silnou inhibiční aktivitu vůči AChE nebo BuChE. Mezi alkaloidy s vyšší inhibiční aktivitou patří např. 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)hemanthamin, který inhibuje lidskou AChE s IC_{50} $4,0 \pm 0,3$ μ M nebo 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)hemanthamin s IC_{50} $9,9 \pm 0,5$ μ M. Vysoká inhibiční aktivita byla naměřena také u derivátu 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)hemanthaminu s hodnotou IC_{50} $15 \pm 1,8$ μ M. Schopnost inhibice BuChE byla naměřena např. u 1-*O*-(2-methoxybenzoyl)hemanthaminu s IC_{50} $3,3 \pm 0,4$ μ M a 11-*O*-(2-chlorbenzoyl)hemanthaminu s IC_{50} $5,6 \pm 0,6$ μ M. Derivát 11-*O*-(2-chlorbenzoyl)hemanthaminu je tzv. duální neselektivní inhibitor cholinesteras, tedy vykazuje inhibici vůči oběma enzymům. AChE inhibuje s IC_{50} $13 \pm 0,8$ μ M. Předpokládá se, že

nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AChE vykazují deriváty s navázanou nitroskupinou na benzoylové části molekuly. Nejvýznamnějších hodnot inhibujících BuChE dosahují molekuly, které mají na benzoylové části navázanou methoxyskupinu. Naopak substituce methylem v poloze 3 nebo 4 výrazně snižuje nebo úplně zbavuje deriváty inhibičního účinku. Methyl navázaný v poloze 2 pravděpodobně umožňuje správné prostorové umístění molekuly do aktivního místa cholinesterasy (brání rotaci benzoylové skupiny).

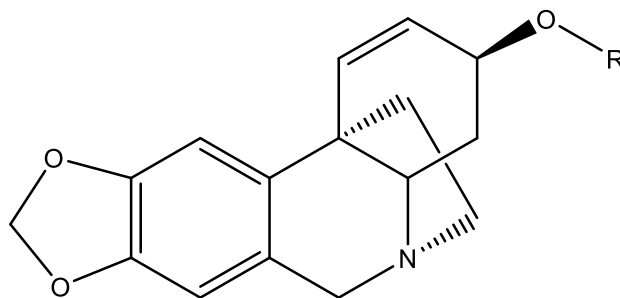
U derivátů hemanthaminu bylo zkoumáno, zda dokáží projít přes hematoencefalickou bariéru. Tato schopnost je zcela nezbytná pro účinek potenciálního léčiva.⁴⁵ Průchod ochrannou bariérou mozku byl testován na umělé membráně PAMPA, přičemž byl využit jako ukazatel průchodnosti logBB. Molekula snadno proniká do centrálního nervového systému (CNS), pokud je její hodnota pro logBB větší než 0,3. Pokud je hodnota nižší, je průnik do CNS nízký nebo žádný.⁴⁶ Bylo zjištěno, že např. 11-*O*-(2-methylbenzoyl)hemanthamin a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)hemanthamin tuto schopnost mají a dokáží přes tuto membránu projít pomocí pasivní difúze. Z výše uvedeného lze aromatické estery odvozené od hemanthaminu považovat za zajímavé výchozí látky pro další vývoj léčiv použitelných v terapii AN.⁴⁵



Obr. č. 16 – Struktura derivátů hemanthaminu

Určité deriváty vittatinu, které patří mezi alkaloidy hemanthaminového strukturního typu, vykazují inhibiční aktivitu vůči AChE nebo BuChE. Vittatin lze od hemanthaminu odlišit substitucí na C3, kdy se u vittatinu nachází hydroxylová skupina a u hemanthaminu methoxy skupina. Druhý rozdíl je na C11 – u vittatinu se na tomto místě nachází vodík, zatímco u hemanthaminu hydroxylová skupina. Pro inhibiční účinek vůči AChE či BuChE je nezbytná přítomnost aromatického acylového zbytku. Vysoká hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE byla naměřena např. u 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatinu s IC_{50} $1,4 \pm 0,1 \mu M$ nebo 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatinu s IC_{50} $5,4 \pm 0,1 \mu M$. Nejvyšší inhibiční aktivity dosahovaly deriváty substituované v *ortho* poloze aromatického kruhu. Deriváty s nitroskupinou v *ortho*

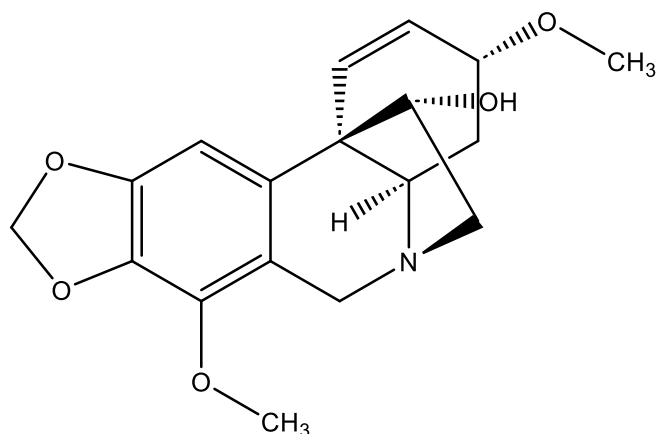
poloze vykazovaly nejvyšší inhibici BuChE, zatímco substituce v polohách *meta* či *para* výrazně snížila inhibiční schopnost vůči tomuto enzymu. Některé deriváty vittatinu, včetně 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatinu a 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatinu, dokáží překonat hematoencefalickou bariéru a dostat se do cílových struktur v CNS. Výzkumné skupiny plánují zkoumat působení derivátů vittatinu i na další možné cíle např. glykogen syntasu kinasu (GSK3- β) nebo β -sekretasu 1(BACE).⁴⁶



Obr. č. 17 – Struktura derivátů vittatinu

Semisyntetické deriváty, vytvořené strukturálními obměnami alkaloidu β -krininového typu ambellinu, mají potenciál v léčbě AN.⁴⁷ Výzkum byl na ambellin zaměřen poté, co esterifikované analogy strukturně blízkého hemanthaminu vykazovaly poměrně silnou inhibici proti AChE a BuChE. Ambellin lze od hemantaminu odlišit rozdílnou orientací 5,10b-ethanového můstku (β -orientace), která pravděpodobně podporuje účinnost vůči BuChE⁴⁵ a výskytem methoxy skupiny na uhlíku č.7.⁴⁷ Předpokládá se, že α -orientace podporuje inhibiční účinek proti oběma cholinesterasám.⁴⁵ Struktura ambellinu obsahuje volnou hydroxy skupinu na uhlíku C11, která umožňuje tvorbu příslušných derivátů. V rámci výzkumu byly vytvořeny alifatické i aromatické estery ambellinu, z důvodu zjištění inhibiční aktivity vůči cholinesterasám.³⁹ Testování ambellinu bohužel zneprjemňovala jeho komplikovaná struktura, která obsahuje obtížně syntetizovatelný kvarterní uhlík.⁴⁷ Během studií se prokázalo, že přítomnost aromatické acylové skupiny je pro účinek inhibice vůči AChE a BuChE nezbytná. Zároveň se zjistilo, že určité aromatické deriváty např. bez substituce nebo s navázaným naftylem či se substituovaným fenylem na aromátu silně inhibují BuChE. Nejsilnější inhibice vůči BuChE byla změřena u 11-*O*-(1-naftoyl)ambellinu.³⁹

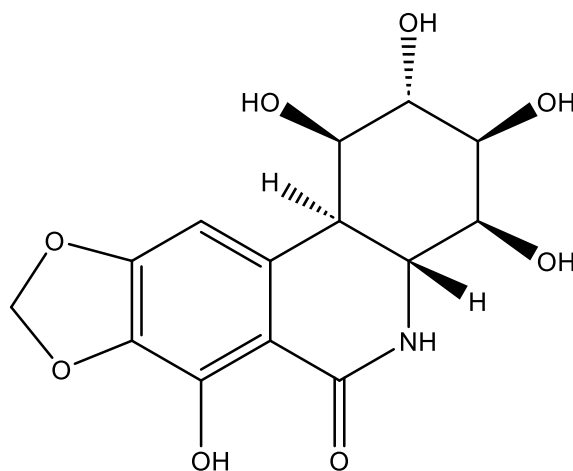
Určité deriváty, odvozené ze struktury ambellinu, vykazují též velmi slibné biologické účinky v oblasti antimalarické aktivity.⁴⁸



Obr. č. 18 – Ambellin

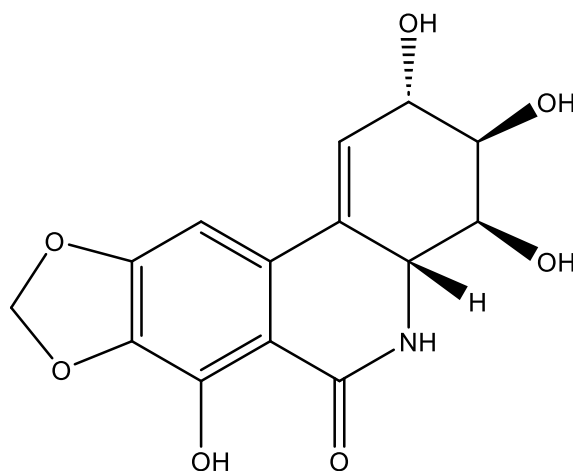
3.3.3 Pankratistatinový strukturní typ

Alkaloidy tohoto strukturního typu obsahují ve své struktuře molekulu fenantridinu. Do této skupiny lze zařadit např. alkaloid pankratistatin nebo narciklasin.⁴¹ Fenantridinový alkaloid pankratistatin byl poprvé izolován roku 1984 z rostliny *Hymenocallis littoralis*. Tento alkaloid je významný pro svou cytostatickou a antineoplastickou aktivitu. Mechanismus přesného protinádorového působení není bohužel zatím známý, je však prokázáno, že souvisí se zvýšením propustnosti mitochondriální membrány a následným uvolněním aktivátorů kaspas a jejich aktivací.^{1,49} Při koncentraci 0,5 μM , pankratistatin vykazuje synergické působení v kombinaci s antiestrogenním lékem Tamoxifenem, který je uplatňován především v terapii karcinomu prsu. Schopnost indukovat apoptózu je pozorována také u kožního karcinomu. Pankratistatin vlastní i antivirové účinky, konkrétně silnou inhibiční aktivitu proti RNA virům ze skupiny flavivirů a bunyavirů a antiparazitární účinky vůči mikrosporidiím.¹



Obr. č. 19 – Pankratistatin

Narciklasin, patřící do skupiny pankratistatinových alkaloidů, byl poprvé izolován z cibulí narcisu roku 1967.¹ Tento alkaloid inhibuje růst rostlin, sazenic i klíčení semen. Narciklasin potlačuje růst eukaryotických buněk. Inhibiční aktivita proti rakovinotvorným buňkám je podložena na základě schopnosti inhibice syntézy ribozomálních proteinů. Ke vzájemné interakci dochází na 60S podjednotce ribozomu, kde narciklasin brání vazbě tRNA na centrum této transferasy.^{1, 49} Narciklasin, stejně tak jako lykorin, haemantamin, dihydrolykorin, pseudolykorin a pretazettin, inhibuje růst buněk HeLa, které jsou příčinou zhoubného karcinomu děložního hrdla.⁵⁰ Narciklasin vykazuje inhibiční působení proti RNA virům ze skupiny flavivirů a bunyvirů a také proti grampozitivním bakteriím rodu *Corynebacterium fascians* či kvasinkám rodu *Cryptococcus neoformans*. 2,3,4,7-tetra-*O*-acetylnarciklasin je účinný proti gramnegativní bakterii *Neisseria gonorrhoeae*, která způsobuje sexuálně přenosnou nemoc kapavku.¹ Strukturální modifikace či obměna narciklasinu vede téměř ve všech případech ke snížení stability, účinku či dokonce k jeho ztrátě.⁵¹

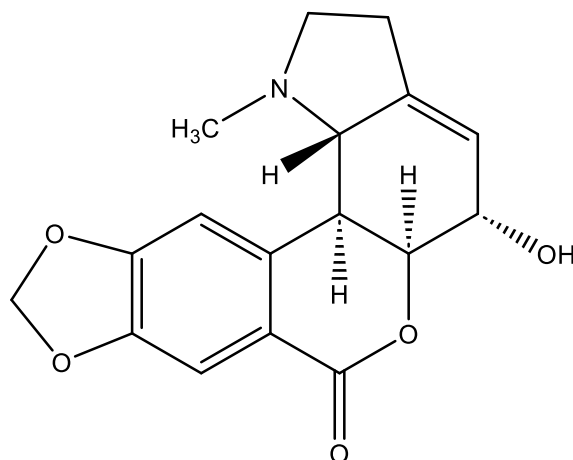


Obr. č. 20 – Narciklasin

3.3.4 Homolykorinový strukturní typ

Alkaloidy homolykorinového typu jsou odvozeny ze struktury 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu.² Do této rozmanité skupiny patří např. alkaloidy homolykorin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin, které se vyznačují inhibiční schopností na určité typy nádorových buněk jako např. HepG2 nebo MOLT-4. Alkaloid hippeastrin se vyznačuje širší škálou působení, má antimykotické účinky proti *Candida albicans*, silné antivirotické účinky účinky proti virům

chřipky a dimerní deriváty odvozené od jeho struktury vykazují poměrně značnou antimalarickou aktivitu.^{2,41}

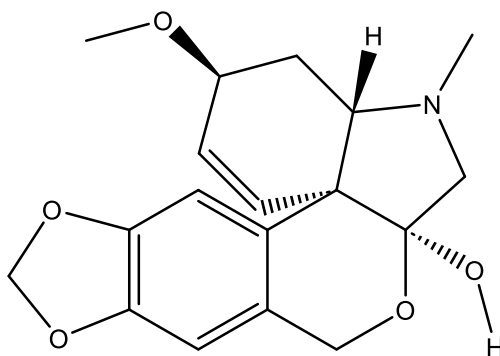


Obr. č. 21 – Hippastrin

3.3.5 Tazettinový strukturní typ

Mezi alkaloidy tazettinového strukturního typu, které jsou odvozeny ze struktury 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu, lze zařadit alkaloid tazettin, pretazettin a 6a-epipretazettin.^{2,52}

Nejrozšířenějším alkaloidem této skupiny je tazettin, který působí mírnými protinádorovými účinky a antimalarickou aktivitou vůči prvokovi *Plasmodium falciparum*.^{41,52,53}

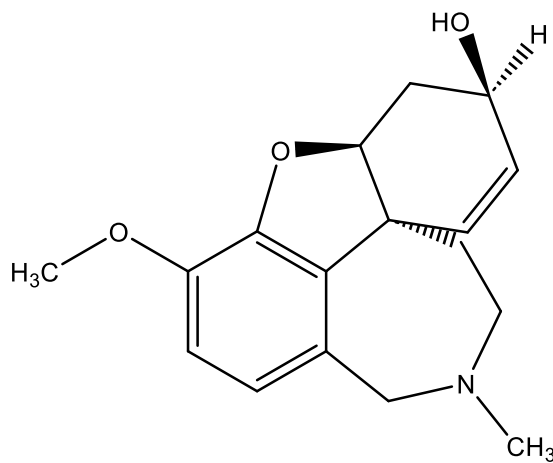


Obr. č. 22 – Tazettin

Alkaloid pretazettin, který je biosyntetickým prekurzorem tazettinu, se od tazettinu liší rozdílnou substitucí na C-6a a C8. Mezi významné biologické aktivity, které pretazettin vlastní, patří silná inhibiční aktivita vůči růstu HeLa buněk a MOLT-4 a antivirotická aktivita proti flavivirům a viru Herpes simplex.^{41,53}

3.3.6 Galantaminový strukturní typ

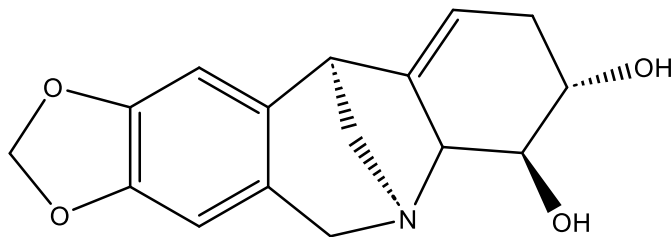
Alkaloidy galantaminového strukturního typu jsou odvozeny ze struktury 6*H*-benzofuro[3*a*,3,2-*ef*]-2-benzazepinu.² Galantamin je dlouhodobě působícím, selektivním, reverzibilním a kompetitivním inhibitorem acetylcholinesterasy, který dokáže překročit hematoencefalickou bariéru a plnit svou funkci v centrálním nervovém systému.¹ Galantamin zaujímá velmi důležitou roli na trhu léčiv neurodegenerativních onemocnění.² Při velmi nízkých koncentracích dokáže alostericky modulovat nikotinové receptory.¹ Studie účinnosti galantaminu probíhaly již v 50 letech v Sovětském svazu a Bulharsku, poté co byl izolován z několika druhů této čeledi. V klinické praxi našel galantamin uplatnění v tlumení bolesti nervů a jako preventivní opatření trvalé paralýzy z Poliomyelitidy zvýšením neurotransmise v mozkové tkáni. V současné době je galantamin využíván v symptomatické farmakoterapii AN. S užíváním galantaminu začal stoupat zájem o výzkum, hledání nových molekul a využití alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae ve farmacii.⁴⁰ Galanthamin nevykazuje cytotoxickou aktivitu, na rozdíl od některých jiných alkaloidů ze skupiny Amaryllidaceae.¹



Obr. č. 23 – Galantamin

3.3.7 Montaninový strukturní typ

Alkaloidy montaninového strukturního typu jsou odvozeny ze struktury 5,11-metanomorfanthridinu. Alkaloid montanin, který je tvořen isochinolinovou strukturou, se váže na serotoninový transportní protein a působí antikonvulzivními, sedativními, anxiolytickými a antidepresivními účinky. Izolace montaninu proběhla poprvé z rostliny *Hippeastrum vittatum*.²



Obr. č. 24 – Montanin

3.4 Alzheimerova nemoc

AN je závažné, celosvětově rozšířené neurodegenerativní onemocnění, které představuje nejčastější příčinu demence a úmrtí. První případ nemoci byl ohlášen roku 1907 Aloisem Alzheimerem.^{54,55} Přesné mechanismy etiopatogeneze nejsou zatím zcela známy. Tuto nemoc charakterizuje úbytek nervových buněk a mozkové tkáně a mezi typické znaky, které se vyskytují u tohoto onemocnění, patří tvorba a ukládání β -amyloidu ($A\beta$), deficit acetylcholinu a neurofibrilární shluky skládající se z *Tau* proteinu.⁴⁵ AN se může vyskytovat samostatně nebo v kombinacích s jinými demencemi např. s vaskulárním typem demence nebo demencí s Lewyho tělísky. Pro pacienty s AN jsou typické výpadky paměti, na začátku nemoci se objevují stavy úzkosti, deprese. Onemocnění je velmi zrádné, protože první příznaky mohou být přisuzovány obyčejnému stárnutí. Lék na AN zatím není znám, ale včasnou symptomatickou léčbou se dá zpomalit její průběh – prodloužením mírných časných stádií nemoci. AN má obrovské důsledky pro jednotlivce, ale i pro celou společnost. Předmětem mnoha výzkumných skupin je intenzivní snaha najít lék na toto onemocnění. Velké množství nemocných je zatím bez terapie, protože jim nemoc nebyla zatím vůbec diagnostikována.^{54,56,57,58,59,60}

3.4.1 Epidemiologie

Demence jsou jedny z nejčastějších chorob ve stáří. Kvůli demografickému vývoji spojeným se stárnutím obyvatelstva nelze předpokládat příznivý vývoj situace ohledně množství nemocných trpících demencemi.⁷ Předpokládá se, že do roku 2050 se výskyt až ztrojnásobí. V současné době se nejvíce lidí trpících demencemi nachází v zemích s nižším nebo středním příjmem.⁵⁶ Demencemi častěji trpí ženy, mají 1,9x vyšší pravděpodobnost výskytu choroby. U Alzheimerovy demence je to dokonce 3,1x.⁶¹ Alzheimerovou chorobou trpí přibližně 1 % celé populace.⁵⁶ V Evropě se vyskytuje zhruba u 2 % lidí. Česká republika se nachází pod průměrem

Evropské unie s 1,36 %, je v ní asi 150 000 lidí s AN. Nejvyšší výskyt AN v Evropské unii je v Itálii, celosvětově je nejhorší situace v Asii. Nárůst nemocných je 7,7 milionu ročně, každé 4 vteřiny přibývá další pacient s AN. AN často vede k invaliditě a následné závislosti na péči blízkých.⁵⁶ Často je nutné zaplatit práci ošetřovatelek, sociální péči nebo např. pobyt v komunitě.⁷ Tato nemoc je proto finančně náročná nejen pro rodinu nemocného, ale i pro celý stát. Na samotnou lékařskou péči je přitom využito jen 16 % ze všech nákladů. Nepříjemné situace spojené s demencí a péče rodinných příslušníků o své blízké stojí Českou republiku 40 miliard ročně. Miliony rodin po celém světě se kvůli AN nachází na hranici chudoby. V České republice snižuje kvalitu života 250 000 lidem.⁵⁶

3.4.2 Etiopatogeneze

Jasná příčina vzniku Alzheimerovy demence není dosud plně známa.⁷ V následujícím přehledu jsou uvedeny typické znaky, vyskytující se při diagnóze AN.

3.4.2.1 Amyloidní plaky

Ukládání A β v extracelulárním prostoru je hlavním znakem AN. Tato bílkovina, ukládaná v tzv. senilní plak, vzniká nesprávným patologickým štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) BACE a γ -sekretasou, a to v nadměrném množství. APP je přirozeně se vyskytující dlouhý transmembránový protein, který je během fyziologického stavu štěpen α -sekretasou na krátké rozpustné fragmenty (beta-peptid₁₋₄₀), které se podílejí na neuroplasticitě mozku a mají protektivní funkci vůči neuronům, chrání synapse. Patologický beta-peptid je tvořen nejčastěji delšími fragmenty o 40, případně 42 aminokyselinách, které se spojují do dvojic, poté koagulují a polymerují v neurotoxický A β . K ukládání A β nedochází jen v mozku, ale také v cévách, kde jsou příčinou tzv. amyloidové angiopatie. Alzheimerovské plaky A β v mozku způsobují degeneraci a úbytek nervových buněk, sterilní zánět s aktivací prozánětlivých mediátorů (interleukinů, cytokinů), uvolnění vysokého množství excitačních aminokyselin a gliový lem.^{7,59,61,62}



Obr. č. 25 – Amyloidní plaky⁶³

3.4.2.2 *Tau* protein

Tau protein patří do skupiny proteinů, které se vážou na mikrotubuly tzv. mikrotubule-associated proteins (MAPs). Funkcemi MAPs je shlukovat a stabilizovat mikrotubulární cytoskelet.⁶⁴ Tyto proteiny se vyskytují v každém zdravém mozku, ale při AN je patologická forma *Tau* proteinu hyperfosforylovaná a uspořádaná do párových helikálních vláken. Následně se společně s $A\beta$ intracelulárně ukládá do tzv. neurofibrilárních tangles (NFTs). NFTs narušují strukturu buněk, způsobují apoptózu neuronů a vedou až k mozkové atrofii a demenci. Dle hypotézy amyloidní kaskády je za toxické uspořádání a hromadění *Tau* proteinu zodpovědná zvýšená tvorba a agregace $A\beta$.^{7,59,64}

3.4.2.3 Apolipoprotein E4

Apolipoprotein E4 (ApoE4) je bílkovina tvořena z 299 aminokyselin (AMK). Přirozeně se nachází v plazmatických lipoproteinech a podílí se na metabolismu a transportu lipidů. ApoE4 je tzv. chaperonem – má schopnost se vázat na $A\beta$, podporovat jeho strukturní obměny a tím zvyšovat jeho toxicitu, vznik Alzheimerovských plaků, uzlíčků a množství $A\beta$ uloženého v cévách. Alela Apo ϵ 4, kterou je gen ApoE4 kódován, je proto považována za jeden z výrazných rizikových faktorů pro kognitivní dysfunkce a vznik AN.^{7,61}

3.4.2.4 Cholinergní hypotéza

Degenerace cholinergních neuronů je jedním ze zásadních problémů doprovázející AN.⁶⁵ Neurotransmitter acetylcholin, jehož struktura se skládá z cholinu a kyseliny octové, se dokáže vázat na dva typy acetylcholinových receptorů – nikotinové a muskarinové.⁶⁶ Muskarinové receptory, které se dále dělí na 5 typů – M1, M2, M3, M4, M5, patří do skupiny metabotropních receptorů a využívají acetylcholin jako sekundárního posla. Muskarinové receptory jsou součástí G- receptorového komplexu a nacházejí se v buněčných membránách neuronů v CNS.

Muskarinové receptory se podílejí procesu učení, motoriky a paměti. Receptory typu M1, které se nacházejí v hippocampu a mozkové kůře, jsou při AN výrazně sníženy. Tyto receptory mají svůj význam také v kognitivním zpracování. Množství receptorů M2 je během AN také zřetelně sníženo. Předpokládá se, že nedostatek těchto receptorů má za následek neuropsychiatrické chování pacientů. Nikotinové receptory, které jsou složeny z pěti podjednotek, jsou ligandem řízené iontové kanály. Jedná se o ionotropní receptory, které nevyužívají sekundární posli jako muskarinové receptory, ale otevírají cestu procházejícím iontům.⁶⁵ Při AN dochází k nedostatku acetylcholinu zejména v presynaptické části nervových buněk, nejvíce v jádru *basalis Meynerti* a drahách z něj vystupujících.⁷ AN postihuje také deficit serotoninu, noradrenalinu, GABA, somatostatinu či substance P.⁷

3.4.2.5 Volné radikály

Mozková tkáň je při AN vystavena zvýšenému oxidačnímu stresu, který je způsoben nerovnováhou mezi volnými reaktivními kyslíkovými a dusíkovými radikály a antioxidační aktivitou organismu.^{7, 67} CNS je na oxidační stres velmi citlivý, protože obsahuje poměrně vysoké množství lipidů a naopak nízké množství antioxidačních látek.⁶⁷ Peroxid vodíku a další volné radikály patří mezi hlavní rizikové faktory neurodegenerace mozkových buněk. V nemocném mozku se nachází větší množství oxidovaných proteinů a pokročilé koncové produkty glykace.⁶⁷ Jedním z důvodů je snížená činnost enzymu superoxid dysmutasy 2, který za fyziologického stavu volné radikály eliminuje více.^{7, 62} A β způsobuje lipoperoxidaci membrán vedoucí ke tvorbě produktů, které tvoří kovalentní vazby s proteiny a tím je modifikují. Lipoperoxidací vzniká např. aldehydový produkt 4-hydroxynonenal, který se váže na *Tau* protein a brání jeho defosforylaci. Dalším závažným problémem je snížená četnost oprav oxidačních poškození, která vedou k hromadění chyb v DNA a následně ke ztrátě nervových buněk.⁶⁷ Poškození zdravých buněk a tkáně vede ke vzniku zánětu, který může ústít k řadě dalších onemocnění.^{7, 68}

3.4.2.6 Genetické faktory

Mutace v genech mají vliv převážně na presenilní formy nemoci. Jednotlivé mutace se začínají rozvíjet vždy v určitém věku. Rizikovými místy na chromozomech pro vznik mutací jsou geny kódující Preseniliny, APP, ApoE4 a *Tau* protein. Preseniliny jsou proteiny, které za fyziologického stavu zprostředkovávají transmembránový přenos. Za patologického stavu,

vzniklého mutací na 1. nebo 14. chromozomu, se podílejí na vzniku A β po interakci s APP. Na degradaci APP je v současné době zaměřen výzkum. Mutace genu kódující Presenilin 1 se vyskytuje s prevalencí 20–70 % nejvíce a je hlavní příčinou vzniku AN s časným začátkem. Dalším genetickým faktorem jsou geny kódující ApoE4 a sortilin-related receptor (SORL1). Chybný SORL1 způsobuje tvorbu A β vlivem špatného intracelulárního transportu APP. Mutace na 17. chromozomu, kde se nachází gen kódující *Tau* protein a na 21. chromozomu s genem pro APP patří také mezi potencionální rizikové faktory AN. Předpokládá se, že k rozvoji AN je potřeba porušení genů na více místech.^{7,56,58}

3.4.3 Klinický obraz

AN se začíná projevovat pozvolna a nenápadně. Často bývá nesprávně považována za příznaky stárnutí. Pacient s AN si bohužel často neuvědomuje, že je nemocný, a tak většina přichází na první vyšetření až ve středně těžkém stádiu demence.⁵⁴ AN můžeme rozdělit podle nastoupení prvních příznaků do dvou skupin. Pokud se objeví dříve než v 65 letech, je nemoc označena jako presenilní. V případě příznaků po 65 letech pacienta jako senilní forma nemoci. AN má téměř lineárně progresivní průběh, bez větších výkyvů. Pokud se nějaké větší výkyvy u pacienta vyskytují, jedná se většinou o přítomnost další patologie např. o vaskulární příčinu, nevhodnou léčbu, somatická onemocnění či dehydrataci. Jedním z prvních projevů nemoci je zapomnětlivost, a to nejvíce v oblasti blízké minulosti. Nemocný si čím dál více nemůže vzpomenout na jména nebo na to, co chtěl právě udělat. Dělalí mu problém složitější aktivity jako např. ovládání telefonu nebo řízení auta. S postupným zhoršením stavu se přestává i prostorově orientovat, např. nemůže najít cestu domů nebo ztrácí osobní věci. U těžších stádií nemoci má nemocný s AN potíže i s nezákladnějšími činnostmi, dělá mu obtíže se sám najít nebo se obléct a často ho trápí inkontinence. Nakonec nepoznává ani své blízké příbuzné.^{54,57} S AN se pojí výskyt duševních obtíží, velmi často trápí pacienty deprese, úzkosti a s nimi spojený nedostatek spánku.⁷ Ubývá různých návyků, objevuje se tvrdohlavost, porucha soudnosti, nepřiměřené emoce, labilita nebo dokonce dochází ke změně osobnosti. V posledních stádiích se stává plně odkázaným na pomoci rodiny a blízkých. Hlavní příčinou exitu bývá bronchopneumonie vzniklá na podkladě úbytku neuronů v mozkové tkáni a vážné úrazy následkem pádu. Průměrná délka onemocnění je mezi 7–10 lety, než dojde ke smrti. Vyskytují se ale i výjimky, kdy ke smrti došlo již např. po 3 letech nebo naopak až po 15.^{54,57}

3.4.4 Diagnostika

K určení diagnózy AN se využívají údaje z anamnézy pacienta, testová i klinická vyšetření. Nejčastěji využívaným a časově nenáročným testem je Mini-mental state examination (MMSE), který je postaven na měření kognitivních funkcí pomocí několika menších testů zaměřených na paměťové a jazykové schopnosti jedince, pozornost a orientaci. Pokud testovaný dosáhne počtu bodů nižšího než 24, je považován za pacienta s demencí. V případě zisku méně než 6 bodů se pacient potýká s těžkou formou demence.⁷ Specifičtější testem je tzv. Clock Drawing test (CDT), který spočívá v úkolu nakreslení ciferníku hodin. Test je výhodný svou rychlostí provedení, lze provést např. i v lékárně při dispenzaci. Je schopen odhalit časnou a pozdní fázi kognitivní poruchy, kdy nemocný trpící AN nezvládá ciferník správně nakreslit. CDT upozorňuje na špatnou schopnost prostorové orientace.



Obr. č. 26 – Clock drawing test⁴⁹

Další z často užívaných testů je Alzheimer's Disease Assessment Scale, který je testem k prověření kognitivních funkcí pacienta ve větší míře a rozsahu než MMSE test. Test zahrnuje několik sekcí, kdy každá prověřuje jiné schopnosti pacienta. Čím většího počtu bodů je pacientem dosaženo, tím jsou kognitivní funkce zhoršeny. K velmi rychlým, krátkým a uznávaným testům patří i Montrealský kognitivní test (MoCA), který je tvořen šesti částmi na jedné A4 papíru. MoCA test se vyznačuje vyšší citlivostí než test MMSE a odhaluje mozkové abnormality s vyšší přesností. Diagnóza Alzheimerovy choroby může být v neposlední řadě potvrzena screeningem mozku, který vykazuje změny v oblasti hippocampu a amygdaly se současným rozšířením komorových prostor. Jedním z hlavních ukazatelů na AN je vyšší hladina Tau proteinu v mozkomíšním moku.^{7,59}

3.4.5 Terapie

Při onemocnění AN je zásadní včasná diagnostika a zahájení správné a individualizované terapie, co nejdříve je to možné. Léčba musí být komplexní. Je třeba dbát na celkovou kondici nemocného, na správnou výživu a hydrataci, vhodně zvolenou tělesnou aktivitu. Je nutná spolupráce s praktickým lékařem a dalšími odbornými lékaři v zajištění léčby přidružených stavů a kompenzace chronických onemocnění. Je potřeba o onemocnění kvalitně informovat pacienta i jeho nejbližší.⁵⁴

3.4.6 Farmakologická léčba

Terapie AN je zaměřena na prodloužení mírných stádií nemoci a tím ke zpomalení jejího průběhu. Snahou je co největší oddálení těžkých stádií choroby, která jsou spojena se spoustou komplikací a již se nedají nijak zvrátit.⁶⁹ Mezi základní farmakoterapii AN řadíme symptomaticky působící iAChE a memantin.⁷

3.4.6.1 Inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

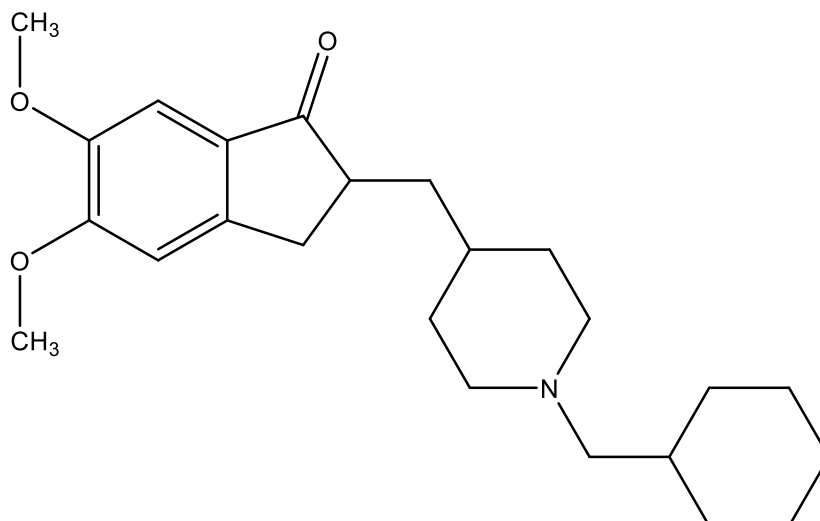
Enzymy AChE a BuChE jsou zodpovědné za hydrolytický rozklad neurotransmiteru acetylcholinu v synaptické štěrbině nervové buňky. IACHe a inhibitory butyrylcholinesterasy (iBuChE) činnost těchto enzymů potlačují, zvyšují hladinu acetylcholinu v mozkové tkáni, mírní proces horšení kognitivních funkcí a zpomalují progresi AN.^{44, 45, 69} Jelikož se AChE vyskytuje v mozku ve vyšší koncentraci než BuChE, nebyl jí do nedávna při hledání vhodné farmakoterapie přikládán větší význam. Pohled na BuChE se změnil, když bylo zjištěno, že aktivita BuChE s progresem onemocnění roste až o 40-90 %. Aktivita AChE naopak přibližně o 33-45 % klesá. Studie se nyní na inhibici tohoto enzymu, který se přirozeně vyskytuje v gliích a nervových buňkách, více zaměřují a snaží se nalézt nová účinnější léčiva.⁴⁵

Mezi evidence-based medicine léčiva řadíme iAChE a iBuChE, které jsou užívány při lehkých a středně těžkých stádiích AN. Tato léčiva jsou určena k potlačování symptomů AN, zlepšují paměťové schopnosti a bdělost, ale nebrání samotné progresi onemocnění.⁷⁰ V České republice jsou iAChE hrazeny zdravotní pojišťovnou všem pacientům, kterým byla AN diagnostikována a v testu MMSE dosáhli hodnocení mezi 13–20 body. Inhibitory cholinesteras jsou nejčastěji spojeny s výskytem nežádoucích účinků působících na gastrointestinální systém. Terapii mohou doprovázet nevolnosti, nechutenství, křeče, bolesti hlavy ale i zvracení. Z těchto důvodů je terapie kontraindikována u pacientů s aktivní vředovou chorobou nebo

s onemocněním srdce převodního charakteru. Opatrnost je nezbytná také u pacientů s diagnostikovanou chronickou obstrukční plicní nemocí, astmatem či močových obstrukcích. Nežádoucí účinky se objevují převážně na počátku léčby a také při rychlém zvyšování dávky léčiva, proto je nezbytné léčivo nasadit v co nejnižší možné dávce a pomalu jej titrovat na maximální dávku, která je ještě pacientem tolerována.⁵⁴ IChE i iBuChE výjimečně snižují srdeční frekvenci, jsou proto kontraindikovány u pacientů léčených betablokátory. Inhibitory můžeme rozdělit do dvou skupin, inhibující pouze AChE nebo na látky inhibující i BuChE. Mezi inhibitory používané v klinické praxi řadíme donepezil, rivastigmin a galantamin.⁵⁹ Kognitiva mohou být předepisována lékaři z oboru neurologie, psychiatrie a geriatric. Pokud není shledán přínos léčby během prvního půl roku terapie, zvažuje se nasazení jiného léčiva.⁵⁴

3.4.6.2 Donepezil

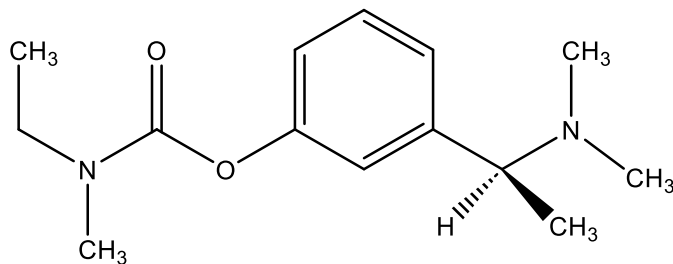
Donepezil je centrálně působícím, specifickým a reverzibilním iAChE užívaným pro snižování symptomů mírného až středně těžkého stádia AN. Enzym BuChE inhibuje téměř zanedbatelně. Po chemické stránce se jedná o piperidinový derivát, v léčivých přípravcích je obsažen ve formě hydrochloridu. Na trhu se vyskytuje od roku 1996 jako léčivý přípravek Aricept. Léčba donepezilem začíná v dávce 5 mg denně. Pokud je dobře tolerován alespoň po dobu 4–6 týdnů, je dávka zvýšena na 10 mg denně. Léčivo je podáváno pouze 1x denně, protože má poměrně dlouhý poločas rozpadu, více než 70 hodin. Maximální koncentrace v krevním oběhu dosahuje již za 3–4 hodiny. Vyšší dávky nebo příliš prudké zvyšování množství podaného léčiva se nedoporučuje z důvodu narůstajících cholinergních nežádoucích účinků. Donepezil je užíván večer, těsně před spaním a nezávisle na jídle, které na jeho vstřebávání nemá vliv. Metabolizace probíhá na cytochromu P450, isoenzymu 3A4 a 2D6. Donepezil doprovází poměrně málo nežádoucích účinků, bývá dobře snášen. Přesto se mohou v začátcích léčby objevit mírné obtíže způsobené nadbytkem acetylcholinu jako je např. nevolnost, průjem, zvracení, bolesti hlavy.^{7,59}



Obr. č. 27 – Donepezil

3.4.6.3 Rivastigmin

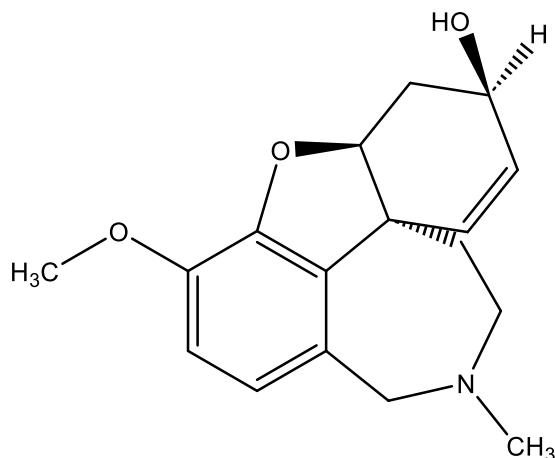
Rivastigmin, který byl registrován v EU roku 1998 a úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA – FDA v roce 2000⁷, je neselektivním iAChE a iBuChE s minimem lékových interakcí. Jedná o pseudoireverzibilní inhibitor, který se vyznačuje velmi pomalou disociací komplexu enzym-rivastigmin. Chemickou strukturou se podobá fysostigminu, alkaloidu z Puchýřnatce jedovatého. Užívá se při terapii AN pro snižování symptomů mírného až středně těžkého stádia a je vhodný při léčbě AN s Lewyho tělísky, protože dobře působí na psychotické příznaky. Rivastigmin bývá užíván i při terapii demence u Parkinsonovy nemoci. Počátek terapie začíná pozvolnou titrací po dobu 4 měsíců. Snahou je mírnění gastrointestinálních obtíží, které se i přesto mohou během titračního období projevit. První měsíc pacient užívá 1,5 mg 2x denně, 2. měsíc 3 mg 2x denně, 3. měsíc 4,5 mg 2x denně a 4. měsíc 6 mg 2x denně. Maximální koncentrace v krvi dosahuje již za 1 hodinu od podání.^{7,54,59} Transdermální léková forma, která je plně hrazena zdravotní pojišťovnou v případě řádného zdokumentování, napomáhá řešit otázku gastrointestinálního diskomfortu. Nevýhodou transdermálního způsobu podání je pomalejší absorpce účinné látky, klinický účinek je podle posledních studií zachován. Dále v současné době probíhá testování intranazálního lékového podání. Rivastigmin by se měl podávat společně s jídlem, jehož přítomnost zvyšuje vstřebávání. Zvětšení plochy pod křivkou – AUC při podání s jídlem je až o 40 %.^{7,54}



Obr. č. 28 – Rivastigmin

3.4.6.4 Galantamin

Alkaloid galantamin je svou strukturou podobný kodeinu. První registrace proběhla v USA v roce 2001. Galantamin je selektivním, reverzibilním iAChE, podporuje účinek acetylcholinu na jím ovládaných nikotinových receptorech jako allosterický modulátor s kratším poločasem rozpadu, a tím podporuje účinnost cholinergního systému. Galantamin se užívá v terapii mírných a středně těžkých příznaků AN.⁷ U galantaminu se vyskytuje nízké množství nežádoucích účinků, pacienti bývá dobře snášen. Mezi vedlejší účinky patří převážně žaludeční obtíže jako jsou nevolnost, nechutenství, závažnější komplikací je vředová choroba kvůli zvýšené produkci kyseliny chlorovodíkové v žaludku. Galantamin působí svými cholinergními účinky na zornici, kdy ji zužuje, zvyšuje činnost žláz se sekrecí a napětí kosterních svalů. Galantamin se užívá na základě lékové formy buď 2x denně nebo pouze 1x ve formě tobolek s postupným uvolňováním. Podání je doporučeno po jídle, kdy se navyšuje hodnota maximální koncentrace v krevním oběhu. Léčbu je doporučováno začínat postupnou titrací, která začíná na 8 mg denně. Po měsíci je terapie navýšena na 16 mg denně. Od třetího měsíce je možné užívat až 24 mg galantaminu za den, pokud je po důkladném zvážení shledán přínos pro pacienta a léky jsou jím dobře snášeny.^{6, 7, 54, 59} Galantamin je na světovém trhu dostupný ve třech lékových formách, v České republice zatím pouze ve formě tvrdých tobolek s retardovaným účinkem. Pacienty je důležité upozornit na interakce s některými léky např. s erythromycinem ze skupiny makrocyclických antibiotik nebo s některými antidepresivy např. amitriptylinem či paroxetinem, které mohou díky inhibici cytochromu 2D6 zvyšovat koncentraci galantaminu v krvi a tím i zvýšit výskyt nežádoucích účinků.⁷



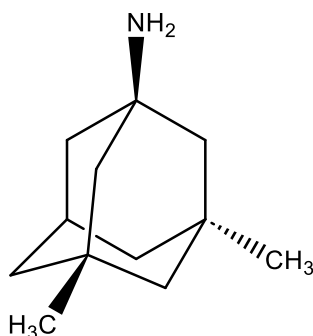
Obr. č. 29 – Galantamin

3.4.6.5 Inhibitory NMDA receptorů

Receptory *N*-methyl-*D*-aspartátové kyseliny (NMDA) jsou zodpovědné za neurodegenerativní změny vlivem otevírání iontových vápenatých a sodných kanálů.⁵⁹ NMDA receptory, tvořeny čtyřmi podjednotkami, vyžadují ke své aktivaci navázání excitačních AMK glutamátu nebo aspartátu a současné připojení glycinu či *D*-serinu.⁷ Při AN jsou NMDA receptory nadměrně aktivovány vlivem stimulace glutamátu a aspartátu a zároveň je účinek glutamátu potencován vlivem sníženého zpětného vychytávání v hipokampu. Nadměrné navazování excitačních aminokyselin má za následek hyperexcitaci NMDA receptorů, při které dochází ke vstupu iontů do nervových buněk a tím k aktivaci několika drah, enzymů, proteinkinás a zvýšené expresi genů, která je zodpovědná za degeneraci buněčné struktury, programovanou apoptózu neuronů a např. za narušení procesu učení tzv. long-term potentiation.

Memantin je účinnou látkou aplikovanou v terapii středně těžké až těžké formy AN,⁷ které lze užívat samostatně nebo kombinovat s inhibitory cholinesteras.⁵⁴ Vykazuje nekompetitivní inhibici se střední afinitou na NMDA receptorech.⁷ Dále také inhibicí receptoru zastavuje přenos signálu a biochemickou kaskádu, která by za normálních okolností následovala a zároveň snižuje množství nežádoucích excitačních AMK.⁷ Memantin je ze začátku léčby postupně titrován o 5 mg každý týden a poté je pacienty užíván 2x denně v dávce 10 mg ve stejnou denní dobu, nezávisle na jídle. Maximální denní dávka je 20 mg. Během léčby se nežádoucí účinky vyskytují jen u malého množství pacientů, ale i přesto by měla být snášitelnost pravidelně sledována.^{7, 59} Při léčbě se mohou výjimečně objevovat excitační nebo psychotické stavy, bolest hlavy, závratě, zmatenost, případně útlum

či halucinace.⁵⁴ V České republice je užívání memantinu hrazeno pojišťovnami, pokud je AN diagnostikována a v testu MMSE je dosaženo mezi 17–6 body.⁵⁹



Obr. č. 30 – Memantin

Tabulka č. 3 – Účinné látky užívané v terapii AN⁵⁴

ÚČINNÁ LÁTKA	LÉKOVÁ FORMA	DÁVKOVÁNÍ	VLIV JÍDLA	HLAVNÍ INDIKACE	MECHANISMUS ÚČINKU
DONEPEZIL	<ul style="list-style-type: none"> • potahovaná tableta • dispergovatelná/rozpuštná tableta • suspenze 	5–10 mg	nezávisle	mírná a středně těžká demence	centrálně působící specifický reverzibilní iAChE
RIVASTIGMIN	<ul style="list-style-type: none"> • tableta • náplast 	3–12 mg	s jídlem	mírná a středně těžká demence	neselektivní inhibitor AChE a BuChE
GALANTAMIN	<ul style="list-style-type: none"> • tablety s prodlouženým uvolňováním 	8–24 mg	po jídle	mírná a středně těžká demence	selektivní, reverzibilní iACHE a allosterický modulátor nikotinových receptorů
MEMANTIN	<ul style="list-style-type: none"> • tableta • p.o. roztok 	5–20 mg	nezávisle	střední a těžká demence	nekompetitivní inhibitor NMDA receptorů a ↓ množství excitačních aminokyselin

3.4.7 Doplnková léčba

K doplňkové léčbě AN lze řadit nootropika a látky, které urychlují metabolismus mozku, *ginkgo biloba* extrakt, látky vycytávající volné radikály, látky zvyšující tvorbu růstových faktorů

nervových buněk, hormonální estrogenní substituci u žen v postklimakteriu, látky pozitivně ovlivňující spánkový cyklus nebo napomáhající vyrovnávat výkyvy nálad u pacientů.⁵⁹ Od užívání nootropik se v poslední době ustupuje z důvodu převažujících nežádoucích účinků nad přínosem léčiva, u pacientů se nadměrně vyskytovaly úzkostné stavy a agitovanost.⁵⁴

3.4.7.1 *Ginkgo biloba*

V terapii AN jsou využívány účinky rostlinného purifikovaného extraktu ze stromu *Ginkgo biloba* (Jinanu dvoulaločného), jehož terapeutický účinek je potvrzen mnoha studiemi.⁵⁴ Léčba po dobu 3 až 6 měsíců s podáváním 120–240 mg extraktu má významný pozitivní efekt na kognitivní funkce.⁷¹ Přípravky s obsahem extraktu navíc bývají pacienty dobře tolerovány, takže mohou být užívány samostatně nebo v kombinaci s kognitiviv.⁵⁴ Před samotným užitím extraktu je nutná zvýšená pozornost u pacientů léčených přípravky na ředění krve nebo přípravky, které antiagregační či antikoagulační efekt mají, neboť *Ginkgo biloba* zvyšuje krvácivost.



Obr. č. 31 – *Ginkgo biloba*⁷²

3.4.7.2 Antipsychotika, antidepresiva

Pokud pacient prožívá halucinace nebo trpí bludy, jsou podávána antipsychotika 2. generace v menších dávkách např. risperidon nebo quetiapin. Pokud je u pacienta indikace k užívání antidepresiv, nejsou předepisována antidepresiva s anticholinergním působením 1. a 2. generace, která by mohla vést k lékovému antagonismu a zvrácení účinku inhibitorů AChE.⁷ Preferovanými antidepresivy jsou citalopram, escitalopram nebo sertralin ze skupiny inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu, ze skupiny serotoninových antagonistů a inhibitorů zpětného vychytávání je lékem volby trazodon, ze skupiny inhibitorů zpětného vychytávání

serotoninu a noradrenalinu venlafaxin a antidepresivum mirtazapin s duálním účinkem ze skupiny noradrenergických specificky serotoninergních antidepresiv.⁵⁹

3.4.8 Nefarmakologická léčba

Pro doplnění komplexnosti léčby je doporučeno dodržovat konkrétní nefarmakologické postupy. Zahrnují různá cvičení, která mohou probíhat buď s odborným zdravotnickým personálem, který je školený Českou Alzheimerovskou společností, nebo pouze s blízkými nemocných.⁵⁹ Zvýšená fyzická aktivita, pohyb a cvičení jsou doporučeny všem pacientům s AN.⁷⁰ Důležité je zaměření i na procvičování aktivit, které pacient zatím nezapomněl jako prevence jejich ztráty.⁵⁹ Pacient se během cvičení nesmí cítit nekomfortně a kognitivní rehabilitace musí podstupovat dobrovolně. U určitých pacientů může být vhodným řešením navštěvování různých stacionářů či klubů, ve kterých se konají skupinové aktivity a vznikají vztahy s ostatními pacienty s AN. V těžších stádiích onemocnění jsou doporučovány spíše individuální aktivity. V závěrečném stádiu nemoci je nutné pacientům zajistit pohodlí, úlevu od bolesti a úzkostných stavů, kterými by mohli trpět kvůli strachu z neznámého prostředí.⁵⁴

3.4.9 Výzkum a hledání nových molekul vhodných k terapii AN

Jelikož léčba iAChE či memantinem je pouze symptomatického charakteru, neléčí příčinu onemocnění a účinkují dočasně a v nízké intenzitě, je výzkum soustředěn na objevení nových molekul působících i jinými mechanismy a na jiné cíle.⁷³

3.4.9.1 Terapie na bázi amyloidu

Z patofyziologie AN se předpokládá, že za spouštěním procesu neurodegenerace stojí primárně hromadění A β v intracelulárním a extracelulárním prostoru, kde tento protein způsobuje zánět a v jeho důsledku následně úbytek neuronů. Patologický A β vzniká štěpícími reakcemi z APP působením BACE a γ -sekretasy. Hlavním cílem výzkumu je proto snížení působení tohoto patologického A β poklesem produkce, odstraněním nebo zmenšením toxicity.⁷³ V současné době je výzkum zaměřen na působení rozpustných A β uvnitř buňky, neboť se časově vyskytují u onemocnění dříve než amyloidní extracelulární plaky.⁷

3.4.9.1.1 Eliminace β -amyloidu

Monoklonální protilátky apinezumab (Pfizer) a solanezumab (Eli Lilly) prošly rozsáhlým výzkumem až do III. fáze klinického hodnocení. Solanezumab měl být potencionálním léčivem v terapii lehké až středně těžké demence. Podporuje odstraňování monomerů A β z mozkové

tkáně vazbou na rozpustnou formu amyloidu. Užívání léčiva u nemocných nevedlo ke zlepšení stavu. Během klinického testování se navíc prokázalo odlišné působení než ve fázi preklinické. Úspěšné farmakoterapie nebylo dosaženo ani s látkou bapineuzumab, která znesnadňuje uskupování amyloidu do plaků a podporuje jeho vylučování z mozku.^{7, 62} Adacanamab je monoklonální protilátka, která dokáže odstraňovat senilní plaky složené z A β a působí zejména na fibrily. Tato látka byla též pozastavena ve III. fázi klinického testování, kdy byla na základě analýzy dat považována za molekulu s nižší než 20% pravděpodobností na úspěch.^{62, 74}

3.4.9.1.2 Inhibice β a γ -sekretasy

Molekuly inhibující BACE mají schopnost snižovat tvorbu A β zablokováním této cesty vzniku. Bohužel často mohou vést k závažným nežádoucím účinkům, protože enzym BACE má širší spektrum účinku např. štěpí neuregulin 1, který se stará o myelinizaci neuronů.⁶² Verubecestat je perorálně podávaný inhibitor BACE-1, který touto cestou dokáže snižovat tvorbu A β v mozkomíšním moku. Na základě studií tento lék bohužel nedokáže zabránit progresi onemocnění u pacientů s mírnou až středně těžkou AN a dokonce na základě některých měření vykazuje zhoršení kognice.^{62, 75}

Inhibitory či modulátory γ -sekretasy, jak již vyplývá z jejich názvu, blokují nebo modulují γ -sekretasový komplex. V inhibitor γ -sekretasy semagacestat, který byl vytvořen firmou Eli Lilly, se vkládaly velké naděje, protože se probojoval až do III. fáze klinického výzkumu. Tato látka dokáže svým mechanismem účinku snižovat množství A β v mozkomíšním moku i plazmě, ale kvůli neprokázané účinnosti na zlepšení kognitivních funkcí a závažným nežádoucím účinkům které způsobovala – zvýšené riziko rakoviny kůže, snižování hmotnosti a systémové infekce, nemohla být potencionálním léčivem v terapii AN. Mezi další zkoušené látky se zařadil i flurbiprofen ze skupiny nesteroidních antirevmatik, ale nebyl u něj nalezen téměř žádný účinek.^{7, 62}

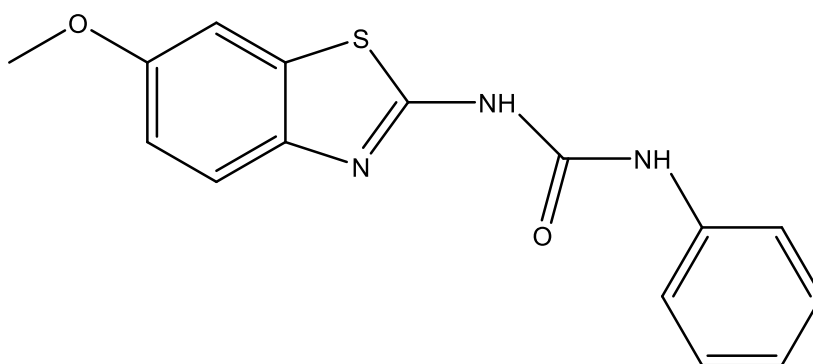
3.4.9.1.3 Inhibice interakce ABAD-A β

Pozornost výzkumu je v současné době zaměřena i na inhibici velmi toxických rozpustných forem A β nacházejících se v intracelulárním prostoru. Nežádoucí formy A β toxicky působí uvnitř mitochondrií, kam prostupují pravděpodobně přes transportní kanály nebo membránu endoplazmatického retikula. V mitochondriích mají vliv na funkci mnoha enzymů např. na amyloid vázající alkoholdehydrogenasu (ABAD), cyklofilin D nebo Htr proteasu A2 – HtrA2.

Vazba A β na ABAD, která pravděpodobně mění vlastnosti tohoto enzymu, se z důvodu zásadního toxického působení na neurony jevila jako potenciální cíl možné terapie v léčbě AN a započal kolem ní rozsáhlý a detailní výzkum.

ABAD, označovaný také jako HADH II, SCHAD, 17 β -HSD10 nebo MBHD je intracelulární enzymový komplex⁶², který při interakci s A β poškozuje mitochondrie, ve kterých se vyskytuje. Působí jako NAD-dependentní oxidoreduktasa redukující aldehydy a ketony na příslušné alkoholy a naopak. Zároveň působí při β -oxidaci mastných kyselin a metabolických dějích isoleucinu, při kterých pomáhá isoleucin rozložit. Pokud je enzym ABAD v organismu nevratně poškozen (navázáním A β), dochází ke škodlivému hromadění isoleucinu a způsobení řady nepříznivých stavů jako např. mentální retardace, epilepsie, vymizení mentálních a motorických schopností. ABAD pravděpodobně působí také oxidačně a inaktivačně na estradiol. Tato skutečnost by mohla vysvětlovat, proč je častější výskyt AN u ženského pohlaví. Předpokládá se také vliv enzymu ABAD na tvorbu tRNA a následnou syntézu bílkovin. Jelikož je vazba A β na ABAD jednoznačně potvrzena, jeví se toto místo jak ideální cíl farmakoterapie.

ABAD-návnadový peptid dokázal bránit vazbě A β na ABAD a zlepšit kognitivní schopnosti u zvířecího modelu. Jelikož jsou ale peptidy málo stabilní a špatně vstřebatelné po p.o. podání, hledá se nízkomolekulární látka podobného účinku. Deriváty Frentizolu jsou schopné blokovat interakci proteinu ABAD a A β , ale pro další postup ve vývoji je nutné zjistit přesný toxický mechanismus působení vazby A β -ABAD a její podstatu.^{7,62}



Obr. č. 32 – Frentizol

3.4.9.2 Terapie zaměřena na *Tau* protein

Dalším možným místem pro zacílení farmakoterapie jsou hyperfosforylované toxické škodlivé fragmenty, které se spojují, tvoří NFTs a následně způsobující buněčnou smrt neuronů.

Za hyperfosforylaci *Tau*-proteinu jsou zodpovědné především enzymy cyklin-dependetní kináza 5 (CDK) a GSK3- β . Mezi neuroprotektivní látky, inhibující CDK5 na zvířecích a tkáňových modelech, patří flavopiridol a roscovitin. Mezi látky ireverzibilně inhibující GSK3- β řadíme např. tideglusib. Tato látka se bohužel nedostala přes II. fázi klinického testování.

Dalším mechanismem působení je inhibice shlukování *Tau* proteinu. Mezi látky s tímto působením patří např. metylenová modř, která zároveň zlepšuje činnost mitochondrií. Metylenová modř neprošla přes III. fázi klinického testování, ale její derivát, který má schopnost rozpouštět agregáty *Tau* proteinu, je stále podrobován dalšímu výzkumu.⁶²

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace

Všechna rozpouštědla, použita v průběhu experimentální práce, byla předem adekvátně predestilována. Prvním krokem destilačního procesu bylo zachycení destilačního předku, který odpovídal přibližně 5 % celkového objemu. Druhým krokem bylo zachycení hlavní frakce, při kterém bylo predestilováno maximálně 90 % původního objemu rozpouštědla.

Rozpouštědla byla následně uchovávána v tmavých, širokhrdlých a patřičně označených lahvích, chráněných před světlem.

4.2 Chemikálie, rozpouštědla, činidla, přístrojové vybavení, rostlinný materiál

4.2.1 Chemikálie, rozpouštědla, činidla

- Destilovaná voda
- Etanol 95 %, denaturovaný methanolem, (EtOH), (Penta a.s.)
- Kyselina chlorovodíková 2% roztok (w/w), (HCl)
- Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru, (Et₂O), (Penta a.s.)
- Chloroform p.a., (CHCl₃), (Penta a.s.)
- Uhličitan sodný 10% roztok (w/w), (Na₂CO₃)
- Síran sodný bezvodý čistý, (Na₂SO₄), (Penta a.s.)
- Toluén, (To), (Penta a.s.)
- Diethylamin, (DIE), (Penta a.s.)
- Činidlo Dragendorffovo

Postup přípravy Dragendorffova činidla

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

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí v 40 ml vody.

Zásobní roztok: roztoky A a B se smíchají v objemovém poměru 1 : 1. Vzniklý roztok musí být uchováván v chladničce při 4 °C po dobu až několika měsíců.

Detekční roztok: 5 ml zásobního roztoku se přidá k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Uchovává se v chladničce při 4 °C po dobu několika měsíců.

- Mayerovo činidlo (Cu₂ [HgI₄])

Postup přípravy Mayerova činidla

5 g jodidu draselného se rozpustí ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku se přidá 1,35 g chloridu rtuťnatého (ve formě prášku). Nejprve vznikne sraženina jodidu rtuťnatého, která se po chvíli za míchání rozpustí na komplexní tetrajodortuťnatan draselný. Objem činidla se doplní do 100 ml. Výsledný roztok musí být čirý, nažloutlé, nanejvýš světle žluté barvy. Roztok se uchovává v chladničce při 4 °C, je stálý několik měsíců.

4.2.2 Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Heidolph-Hei-VAP Advantage G1
- Ultrazvuková vodní lázeň Sonorex super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Vařič Hyundai
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 790 A s hmotnostním detektorem 5975C inert MSD. EI mód 70eV, kolona HP-5 MS (30 m x 0,25 μm), (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- UV lampa
- Spektrometr VNMR S500, sonda OneNMR (širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda se schopností regulace teploty)
- Polarimetr ADP 220 BS

4.2.3 Databáze

Knihovna EI-MS spekter NIST VIRTUAL LIBRARY 2011 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)

4.2.4 Rostlinný materiál

Zmražené cibule jednotlivých kultivarů rodu *Narcissus* sp., konkrétně *Narcissus* cv. Banana Splash, *Narcissus* cv. Gentle Giant, *Narcissus* cv. Las Vegas, *Narcissus* cv. Lemon Beauty, *Narcissus* cv. Mary G. Lirette, *Narcissus* cv. Orange Progress a *Narcissus* cv. Pink Wonder. Cibule byly zakoupeny od firmy Lukon Glands se sídlem v Lysé nad Labem. Po zakoupení byla provedena botanická identifikace prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a následně byly cibule zváženy, zmrazeny a uchovávány v mrazícím boxu.

4.3 Popis provedených experimentů

4.3.1 Příprava alkaloidních extraktů

Rozmražené cibule jednotlivých kultivarů rodu *Narcissus* byly rozkrájeny a rozmixovány na menší kousky. Poté byly vloženy do větší Erlenmayerovy baňky a zality přibližně 1,2 l EtOH 95% tak, aby byly zcela ponořeny. Baňka s drogou se položila do vodní lázně na vařič a byla přivedena k varu pod zpětným chladičem. Po 30minutovém varu se nechala baňka ochladit a obsah byl přefiltrován přes vlizelín. Tento proces byl zopakován celkem 3x. Jednotlivé filtráty byly spojeny a odpařeny dosucha na vakuové odparce a následně zváženy viz. tabulka č. 4. Poté byl EtOH extrakt rozpuštěn v 500 ml 2% HCl a ponořen do ultrazvukové vodní lázně pro lepší rozpuštění látek. Okyselení bylo provedeno z důvodu převedení alkaloidních bazí na ve vodě rozpustné soli, čehož se využívá pro přečištění od balastních látek. Okyselený extrakt byl přefiltrován a baňka vypláchnuta destilovanou vodou, aby došlo ke kvantitativnímu převedení extraktu. Filtrát byl převeden do 2000ml dělicí nálevky a 3x vytřepán Et₂O o objemu 150 ml, aby došlo k přestupu nepochárních látek do organického rozpouštědla. Spodní vodná, kyselá vrstva byla sbírána a následně, po alkalizaci 10% Na₂CO₃ na pH 9-10, 3x vytřepána s 200 ml CHCl₃. Alkalizací se ze solí opět staly baze, které při třepání přešly do dolní CHCl₃ vrstvy, která byla následně sbírána. Do kádinky se spojenými CHCl₃ vrstvami byl přidán Na₂SO₄ z důvodu zbavení se zbytkové vody. Poté následovala filtrace přes filtrační papír a odpaření do sucha na vakuové odparce. Aby se potvrdila nepřítomnost alkaloidů ve zbylé vodné vrstvě v dělicí nálevce, byl proveden test s Mayerovým činidlem. Toto činidlo po přidání k okyselenému vzorku vytváří v přítomnosti alkaloidů bílou sraženinu. Ve vodné fázi se sraženina nevytvořila, což signalizovalo, že veškeré alkaloidy přešly do CHCl₃.

Alkaloidní extrakt byl rozpuštěn v malém množství CHCl₃ a EtOH a kvantitativně převeden do malé vialky, určené pro uchovávání vzorků. Přebytečné rozpouštědlo bylo odpařeno za pomoci vodní lázně. Po kompletním dosušení alkaloidního extraktu, za sníženého tlaku v exikátoru nad silikagelovými perlami, byly naváženy jednotlivé vzorky k analýze pomocí GC-MS a ke stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám.



Obr. č. 33 – Navážené vzorky pro testování inhibiční aktivity

Tabulka č. 4 – Hmotnost cibulí jednotlivých kultivarů narcisů a získaných extraktů

Číslo vzorku	Název kultivaru	Hmotnost cibulí (g)	EtOH extrakt (g)	Alkaloidní extrakt (mg)
AL-720	BANANA SPLASH	322,8	19,1	942,8
AL-726	GENTLE GIANT	308,7	18,4	1074,4
AL-731	LAS VEGAS	342,3	27,7	650,7
AL-732	LEMON BEAUTY	183,9	15,4	318,7
AL-735	MARY G. LIRETTE	427,1	26,7	691,6
AL-737	ORANGE PROGRESS	375,7	22,9	474,0
AL-741	PINK WONDER	368,2	25,0	420,3



Obr. č. 34 – Proces získávání alkaloidního extraktu

4.3.2 Identifikace alkaloidů pomocí GC-MS analýzy

Analýza alkaloidních extraktů byla provedena za pomoci plynového chromatografu, kde jako mobilní fáze bylo využito helium s rychlostí průtoku 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C, za využití 1 µl metanolickeho roztoku analyzovaného vzorku o koncentraci 1 mg/ml, split 1:10. Hodnoty během měření byly v rozsahu od 40 do 600 m/z. K určení jednotlivých alkaloidů bylo využito porovnávání spekter za pomoci knihovny EI-MS spekter NIST 11 a souboru spekter látek, které již byly v minulosti v laboratoři izolovány. GS-MS analýza je pouze orientační, pro přesné určení látek je nezbytná izolace a podrobení dalším analýzám.

4.3.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči lidským AChE a BuChE

4.3.3.1 Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid p.a., (ATChI), (Sigma Aldrich, Praha)
- Butyrylthiocholin jodid p.a., (BuTChI), (Sigma Aldrich, Praha)
- Dimethylsulfoxid p.a., (DMSO), (Sigma Aldrich, Praha)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98 %, (DTNB), (Sigma Aldrich, Praha)
- Eserin (Sigma Aldrich, Praha)
- Huperzin A 95 %, (TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- Galanthamin hydrobromid 95 %, (Changsha Organic Herb Inc., China)

4.3.3.2 Činidla

- Roztok 5mM DTNB
- Roztok 10mM ATChI
- Roztok 10mM BuTChI

4.3.3.3 Tlumivé roztoky (pufry)

- 100mM fosfátový pufr - pH 7,4

4.3.3.4 Přístrojové vybavení

- Třepačka VWR standard analog shaker 1000, (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)
- Reader Synergy™ HT Multi. Detection Microplate Reader, (Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Program pro vyhodnocení statistických dat GraphPad Prism, (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.3.3.5 Rekombinantní enzymy

Enzymy pro tento test byly připraveny rekombinantní technologií na Katedře chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Pro měření se využilo médium s obsahem enzymu buď AChE nebo BuChE. Médium bylo rozpipetováno dle vypočítaného potřebného množství k odpovídajícímu ředění do Eppendorfových zkumavek, zmrazeno a uchováváno při teplotě $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. V čase potřeby bylo médium obsahující enzymy naředěno 100mM fosfátovým pufrům o pH 7,4.

4.3.3.6 Stanovení aktivity enzymů

Aktivita enzymů, a tedy množství potřebné k jejich ředění bylo zjištěno experimentálním měřením následujícím způsobem. Do 6 jamek mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno 8,3 μl naředěného média příslušného enzymu v určitém poměru s pufrům, 283 μl 5mM DTNB a 8,3 μl DMSO. Směs byla 1 minutu třepána, inkubována 5 minut v komoře readeru Synergy™ při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté k ní bylo přidáno 33,3 μl roztoku substrátu (10mM ATChI nebo 10mM BuTChI) v závislosti na tom, jaký typ enzymu byl měřen. Po 2 minutách byla změřena absorbance jejíž rozdíl za 1 minutu sloužil pro další případnou úpravu poměru roztoků médií a pufru, tak aby výsledný rozdíl absorbance za 1 minutu byl pro AChE v rozmezí 0,08-0,15 a pro BuChE 0,18–0,20.

4.3.4 Stanovení inhibiční aktivity

Ke stanovení hodnoty inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda za využití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) a esterů thiocholinu jako substrátu. Acetylthiocholin jodid a butyrylthiocholin jodid byly zvoleny z důvodu štěpení příslušnými cholinesterasami na odpovídající kyselinu a thiocholin, ze kterého se následně thiolová skupina váže na DTNB za vzniku žlutého produktu. Proběhlo měření nárůstu absorbance za 1 minutu, ze kterého se pomocí vzorce stanovuje inhibiční aktivita. Měření bylo provedeno při vlnové délce 412 nm.

4.3.4.1 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů

Pro zjištění inhibiční aktivity jednotlivých alkaloidních extraktů bylo provedeno screeningové měření, při kterém byly extrakty proměřeny v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ v DMSO. Do mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno 8,3 μl naředěného enzymu, 283 μl 5mM DTNB a 8,3 μl roztoku alkaloidního extraktu ($c = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$). Do slepého vzorku se místo extraktu pipetovalo

stejné množství DMSO. Směs byla poté 1 minutu třepána a inkubována 5 minut v komoře readeru při teplotě 37 °C. Na závěr bylo přidáno 33,3 µl roztoku příslušného substrátu. Po 2 minutách byla změřena absorbance jejíž rozdíl za 1 minutu byl použit pro výpočet procenta inhibičního potenciálu daného extraktu. Celé měření bylo provedeno v triplicátu 3x.

Vzorec pro vypočítání procent inhibice:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA}\right)$$

% I – procento inhibice

ΔABL – nárůst absorbance slepého vzorku během 1 minuty

ΔASA – nárůst absorbance měřeného vzorku během 1 minuty

U alkaloidních extraktů s inhibicí větší než 60 % byla následně stanovena hodnota IC_{50} . Extrakty byly měřeny v koncentracích 500 – 50 – 5 – 0,5 – 0,05 µg/ml. Hodnota IC_{50} byla vypočítána za pomoci nelineární regrese v programu GraphPaD Prism porovnáním poklesu inhibičních aktivit vůči AChE, BuChE v závislosti na koncentraci. Zjištěné hodnoty byly následně porovnány s hodnotami referenčních látek galantaminu, eserinu a huperzinu A, známých inhibitorů cholinesteras.

4.3.5 Separace alkaloidů kultivaru AI-735 (MARY G. LIRETTE)

4.3.5.1 Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii

- Jako nejvhodnější mobilní fáze byla vybrána směs To a DIE v poměru 90:10

4.3.5.2 Stacionární fáze pro tenkovrstvou chromatografii

- Nalévané skleněné desky se silikagelem o rozměrech 15 x 15 cm
- Hliníkové desky TLC Silica gel 60_{F254} (Merck, Německo)

4.3.5.3 Rostlinný materiál

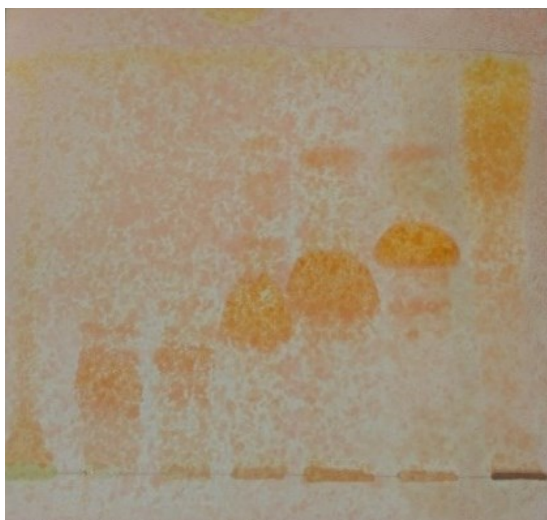
- Alkaloidní extrakt získaný z cibulí *Narcissus* cv. Mary G. Lirette

4.3.5.4 Izolace alkaloidů

Na základě předchozí GC/MS byl pro další fytochemickou práci vybrán extrakt AL-735. Tento extrakt podle spektra obsahoval nejméně 7 alkaloidních látek z nichž byl nejvíce zastoupen

galanthin, který je vhodný pro přípravu polosyntetických derivátů. Izolace galanthinu byla hlavním důvodem pro další zpracování tohoto extraktu.

K separaci jednotlivých alkaloidů ze vzorku bylo nejprve nutné najít mobilní fázi (MF), ve které dochází k ideálnímu rozdělení alkaloidů. Jako nejvhodnější se pomocí provedených analytických tenkovrstvých chromatografií (TLC) jevila MF To:DIE v poměru 90:10. Poté následovala samotná izolace pomocí preparativní TLC. Alkaloidní extrakt byl nejprve rozpuštěn ve směsi ethanolu a chloroformu a poté opatrně nanášen v množství přibližně 35 mg/deska do vodorovné čáry ve výšce 1,5 cm na každou z 20 skleněných desek se silikagelem. Tyto desky byly následně umístěny do komor nasycených parami MF a nechaly se 2x vyvíjet. Mezi jednotlivými vyvíjeními byly desky vždy vysušeny. Po druhém vyvinutí byly chromatogramy vysušeny a alkaloidy separovány na základě viditelnosti pod UV lampou a postříkem Dragendorffovým činidlem. Jednotlivé zóny se stejným retenčním indexem byly vyškrábány a poté byl vzorek ze silikagelu získán vymytím směsí ethanolu a chloroformu filtrací přes vatku. Filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Některé alkaloidy byly překrytalizované z roztoku chloroformu s přídavkem ethanolu. Celkem z tohoto extraktu bylo separováno 7 zón u nichž se následně provedla kontrolní analytická tenkovrstvá chromatografie (TLC) za detekce pomocí Dragendorffova činidla pro zjištění účinnosti separace alkaloidních látek.



Obr. č. 35 – Kontrolní TLC, alkaloidy zvýrazněny Dragendorffovým činidlem

Čistota a identifikace jednotlivých alkaloidů byla dále ověřena pomocí GS-MS analýzy. Čisté izolované látky byly následně podrobeny NMR analýze pro potvrzení předpokládané struktury. NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie,

Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Měření i následnou interpretaci provedl doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. za využití spektrometru VNMR S500, který pracuje při frekvenci 500 MHz pro ^1H jádra a při frekvenci 125 MHz pro ^{13}C jádra. Měření proběhlo při teplotě 25 °C v roztocích CDCl_3 . K ozařování i detekci signálu byla použita sonda OneNMR, která je širokopásmovou dvoukanálovou gradientní sondou se schopností regulace teploty. Chemické posuny δ byly změřeny jako hodnoty pars per milion (/ppm) a nepřímě vztaženy k TMS (tetramethylsilanu) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Pro CDCl_3 jsou hodnoty chemického posunu u atomů ^1H $\delta = 7,26$ ppm, u atomů ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Data získaná měřeními jsou uvedena v následujícím pořadí: chemický posun δ (ppm), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, dd = dublet dubletu, ddd = dublet dubletu dubletu, td = triplet dubletu, m = multiplet, bs = široký singlet), integrační konstanta J (Hz). Separované alkaloidy byly zváženy a váhy byly zaznamenány do tabulky č. 5.

Tabulka č. 5 – hmotnosti jednotlivých separovaných alkaloidů výsledky GC/MS analýzy

Číslo podfrakce	Hmotnost alkaloidu [g]	Předpokládaná struktura dle GC/MS
1	0,1032	9-O-methylpseudolykorin
2	0,1037	Demethyllykoramin
3	0,0468	N-demethylgalanthamin/ Epi-nor-galanthamin
4	0,1499	Galanthin
5	0,0556	Pluvin
6	0,0687	Acetylpluvin
7	0,0637	?

Optická otáčivost derivátů byla měřena v roztocích derivátů pomocí automatického polarimetru. Měření bylo provedeno v prostředí methanolu při teplotě 24 °C, při koncentraci měřeného vzorku 0,1 g/100 ml a s délkou kyvety 0,5 dm. Pro každý vzorek bylo provedeno celkem 5 měření a z jejich průměrné hodnoty byla následně vypočítána specifická otáčivost pomocí níže uvedeného vzorce:

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

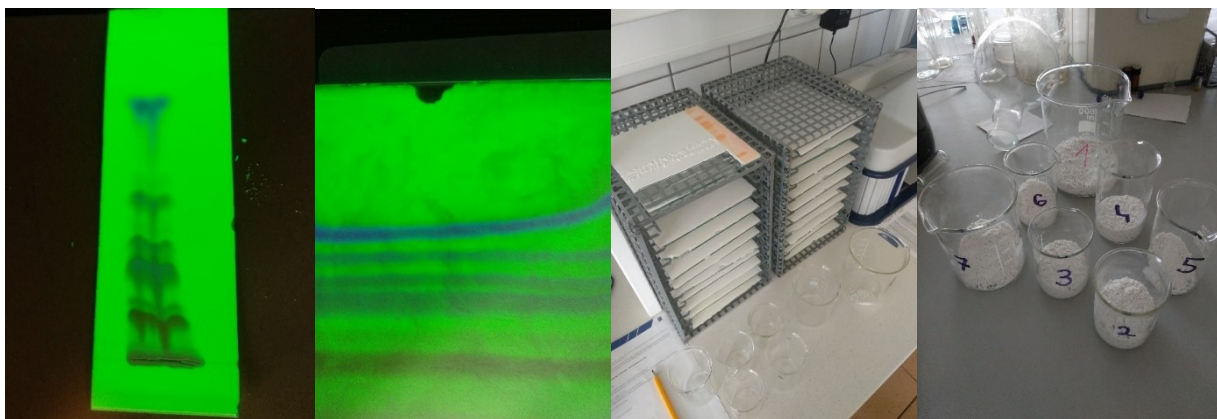
α = naměřená optická otáčivost [°]

t = teplota měření [°C]

D = vlnová délka D-linie sodíkového světla nm (= 589,3 nm)

c = koncentrace měřeného alkaloidu v roztoku [g/100 ml]

l = délka kyvety [dm]



Obr. č. 36 – Postup při rozdělování alkaloidní směsi na jednotlivé alkaloidy

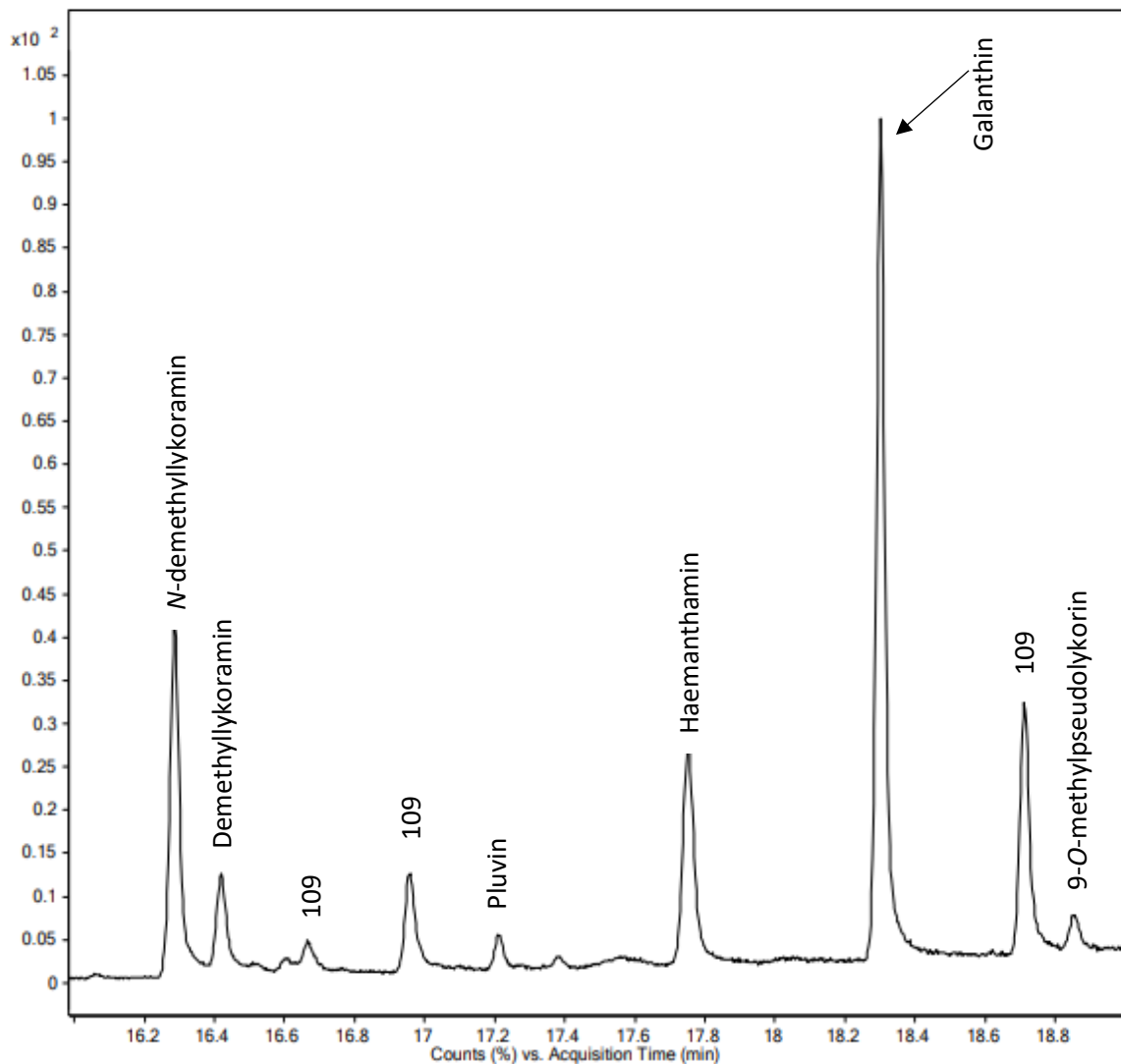


Obr. č. 37 – Vykrytalizované alkaloidy vzorku AL-735

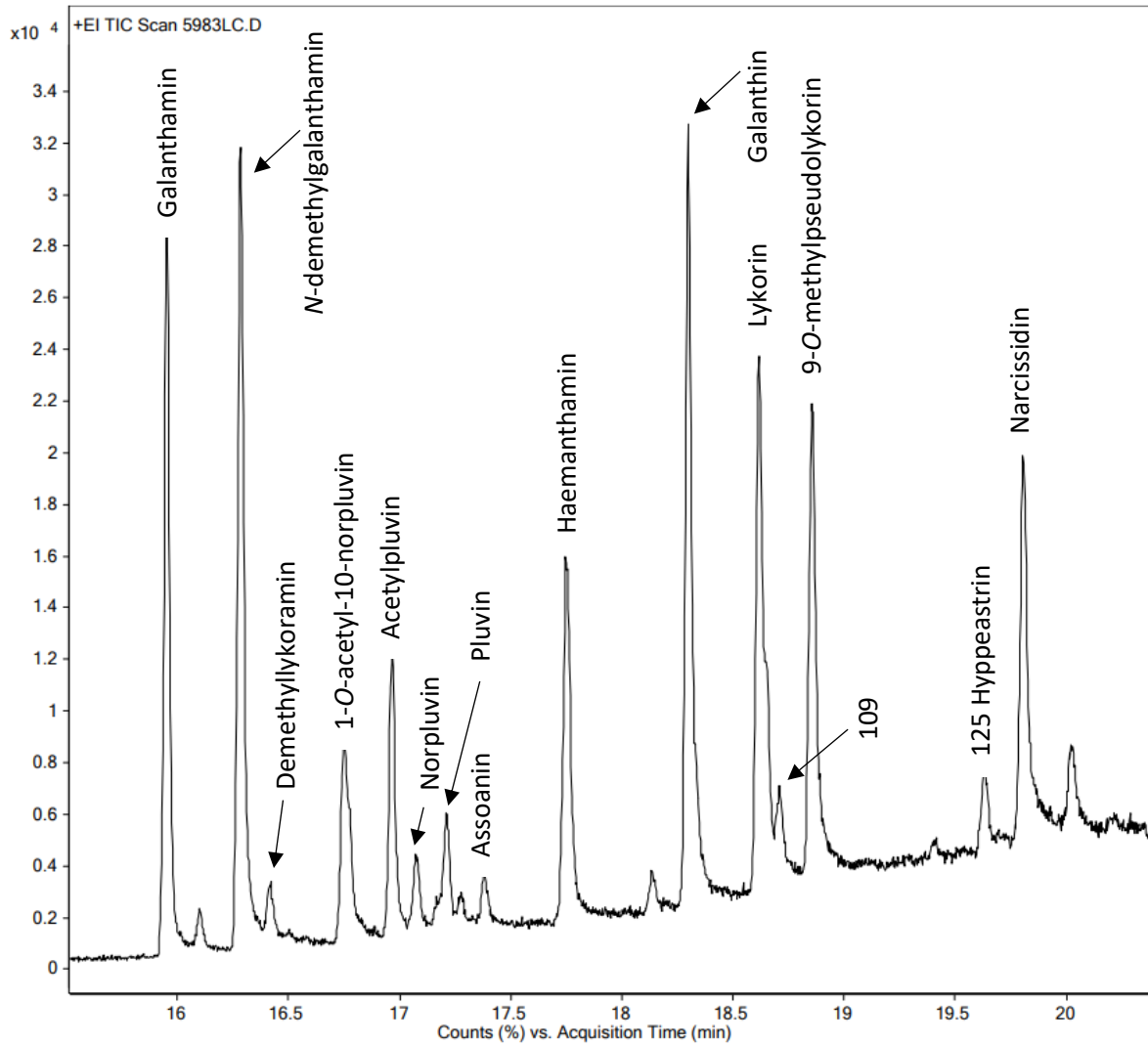
5 Výsledky

5.1 Chromatogramy jednotlivých sumárních extraktů

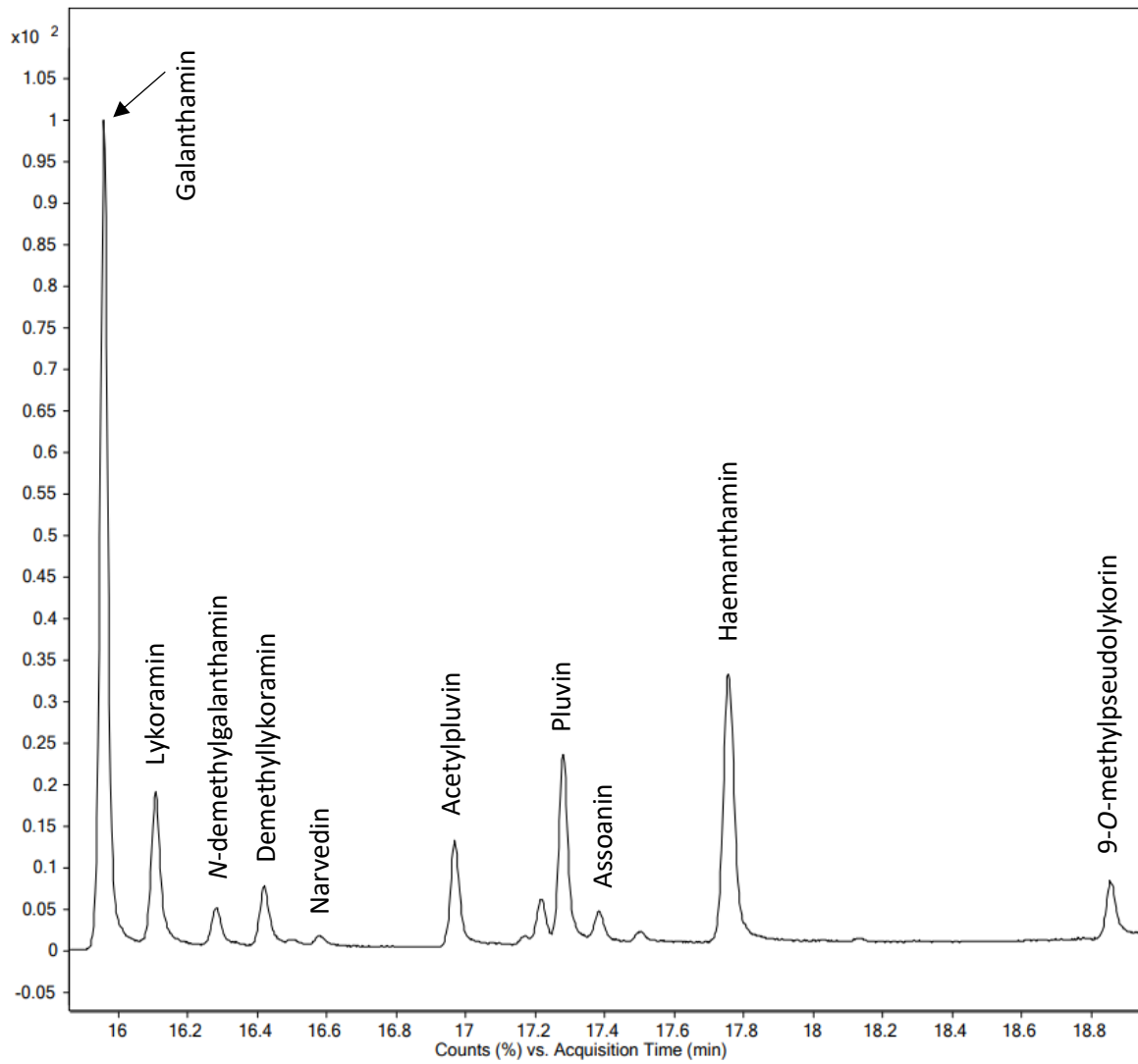
V této kapitole jsou uvedeny chromatogramy jednotlivých alkaloidních sumárních extraktů s uvedením předpokládané identifikace alkaloidů.



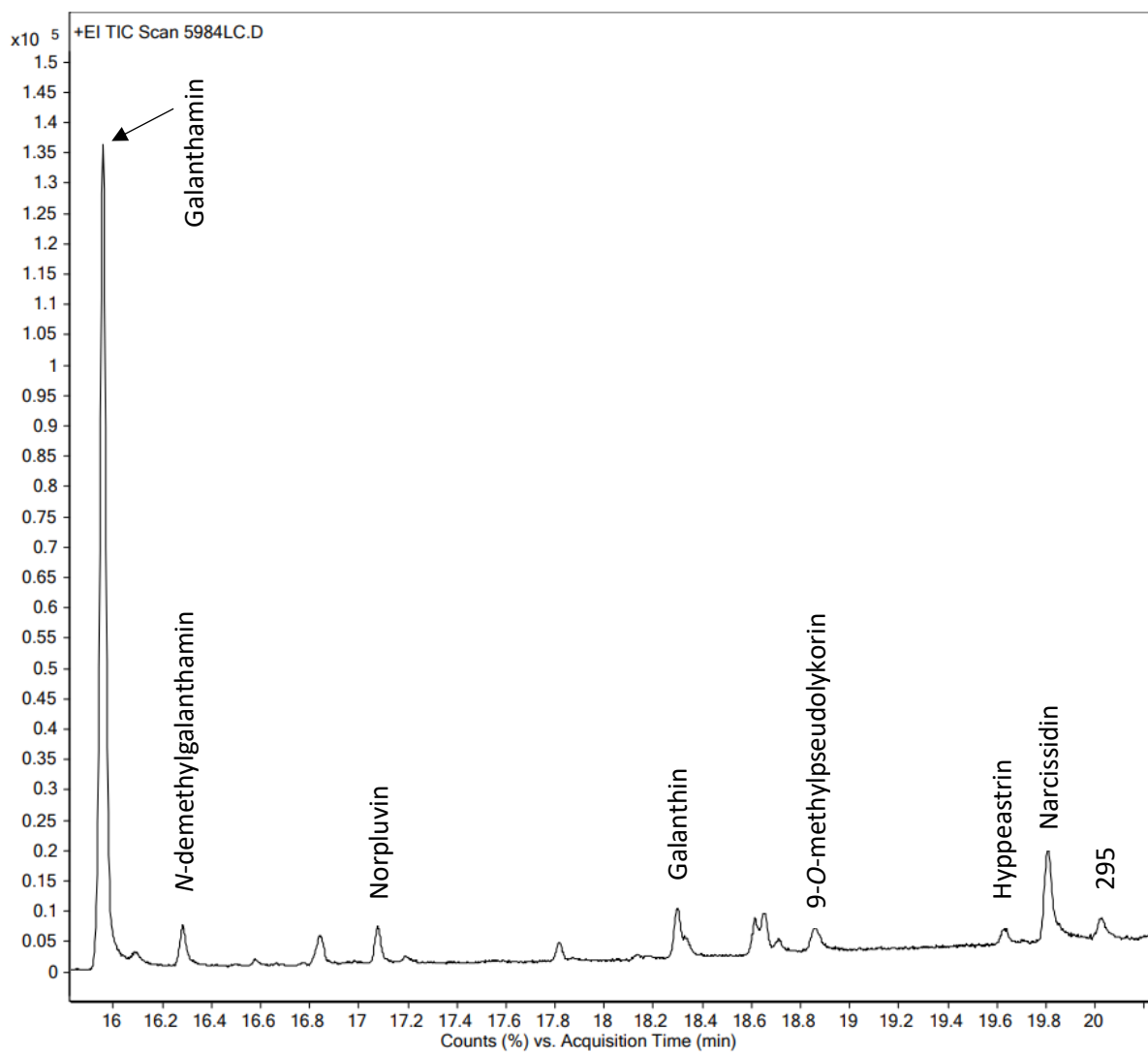
Obr. č. 38 – Chromatogram vzorku AL-720



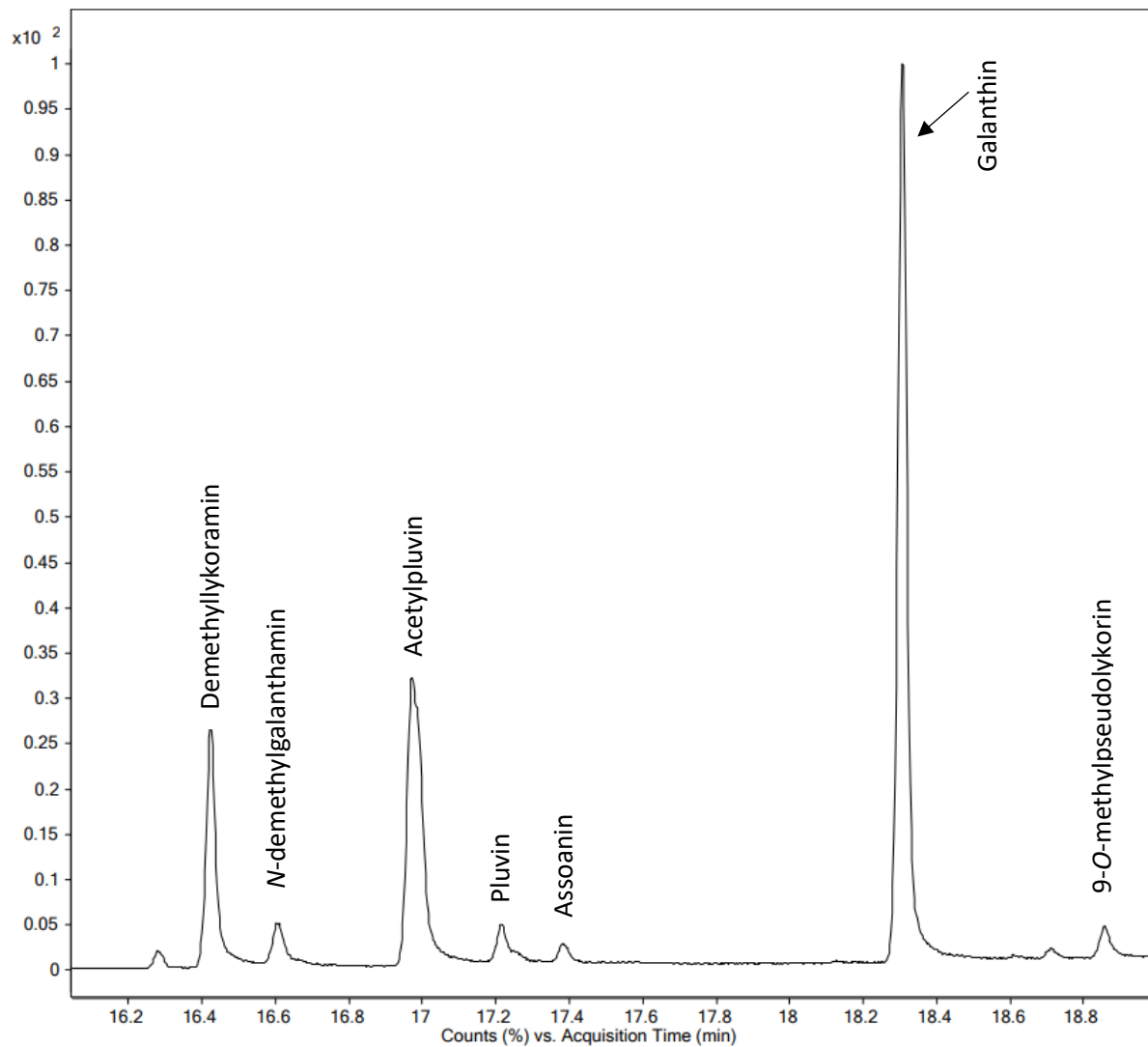
Obr. č. 39 – Chromatogram vzorku AL-726



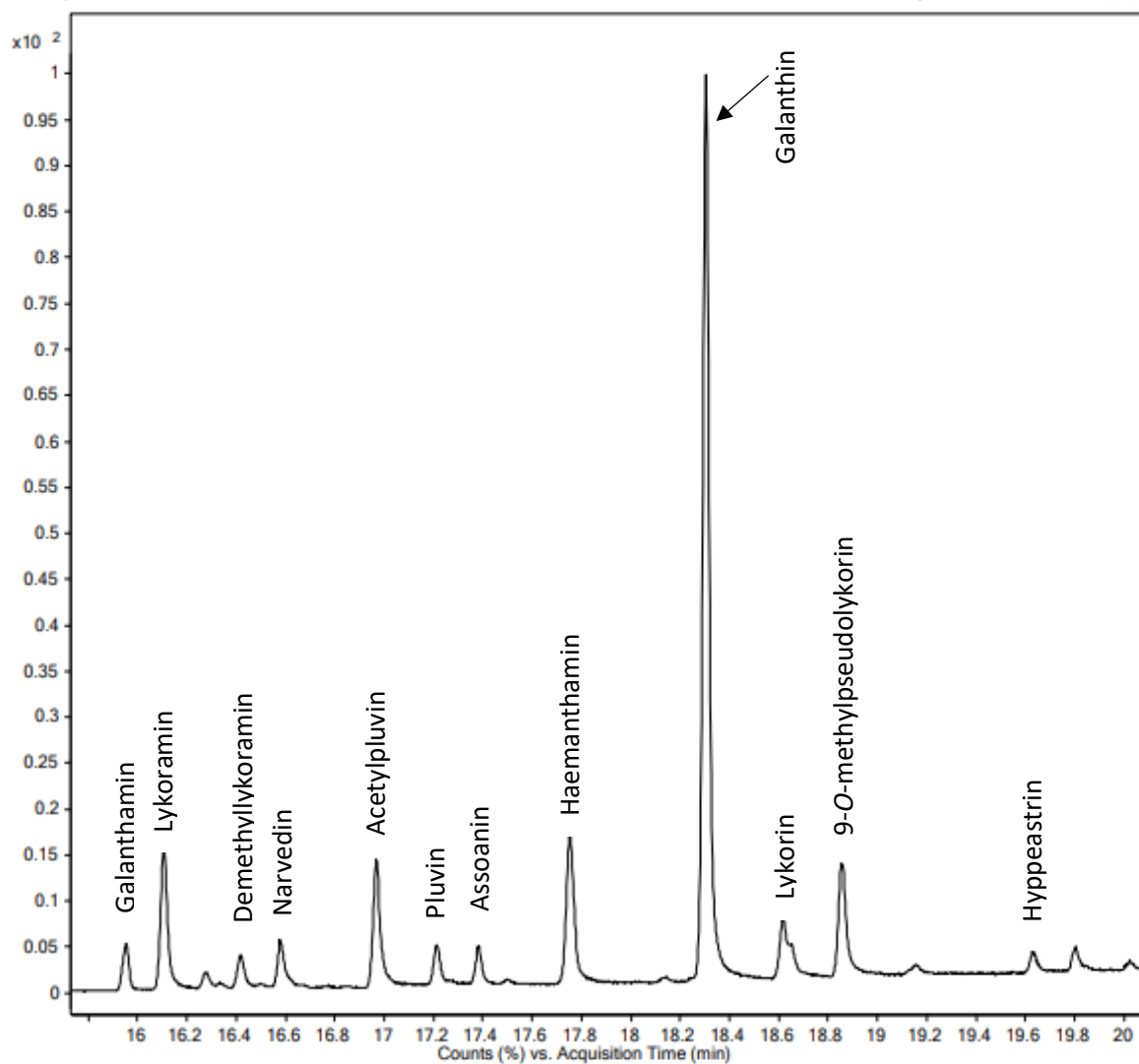
Obr. č. 40 – Chromatogram vzorku AL-731



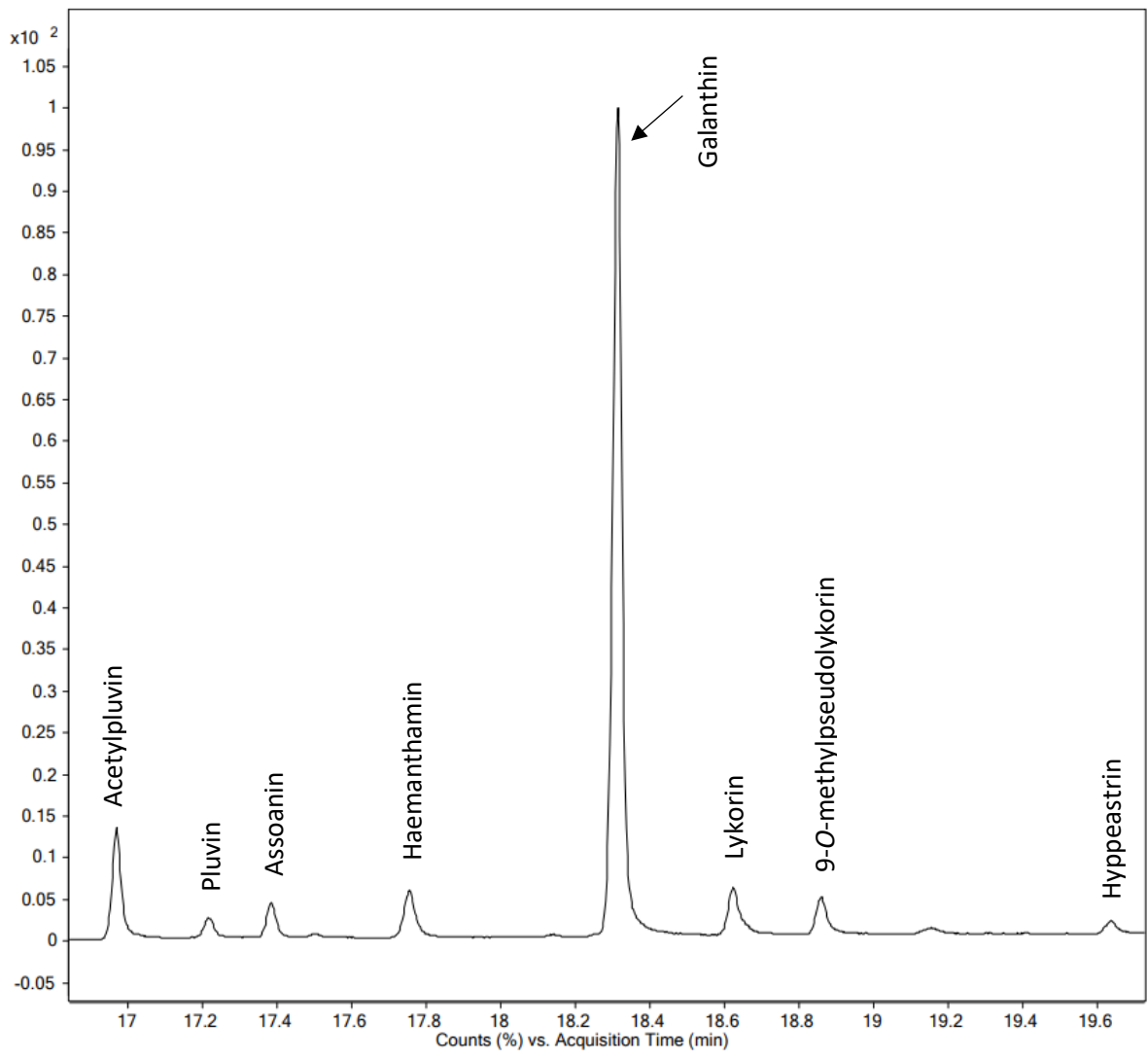
Obr. č. 41 – Chromatogram vzorku AL-732



Obr. č. 42 – Chromatogram vzorku AL-735



Obr. č. 43 – Chromatogram vzorku AL-737



Obr. č. 44 – Chromatogram vzorku AL-741

5.2 Zastoupení alkaloidů v jednotlivých kultivarech

V následující tabulce jsou uvedeny předpokládané alkaloidy dle GC/MS analýzy v jednotlivých extraktech kultivarů rodu *Narcissus*.

Tabulka č. 6 – Alkaloidy zjištěné v jednotlivých kultivarech

Zjištěný alkaloid	Název kultivaru + číslo vzorku						
	BANANA SPLASH	GENTLE GIANT	LAS VEGAS	LEMON BEAUTY	MARY G. LIRETTE	ORANGE PROGRESS	PINK WONDER
	AL-720	AL-726	AL-731	AL-732	AL-735	AL-737	AL-741
Galanthamin	-	+	+	+	-	+	-
Norpluvin	-	+	-	+	-	-	-
Galanthin	+	+	-	+	+	+	+
Lykorin	-	+	-	+	-	+	+
9-O-methylpseudolykorin	+	+	+	+	+	+	+
Hypeastrin	-	+	-	+	-	+	+
N-demethylgalanthamin	+	-	+	+	+	-	-
Narcissidin	-	+	-	+	-	-	-
Demethyllykoramin	+	+	+	-	+	+	-
Pluvin	+	+	+	-	+	+	+
Haemanthamin	+	+	+	-	-	+	+
Lykoramin	-	+	+	-	-	+	-
1-O-acetyl-10-norpluvin	-	+	-	-	-	-	-
Acetylpluvin	-	+	+	-	+	+	+
Assoanin	-	+	+	-	+	+	+
Narvedin	-	-	+	-	-	+	-

5.3 Inhibiční aktivita jednotlivých alkaloidních extraktů vůči

AChE, BuChE

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky měření inhibičních aktivit vůči lidské acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase sledovaných kultivarů rodu *Narcissus*. Zjištěné hodnoty byly porovnány s referenčními látkami.

Tabulka č. 7 – Inhibiční aktivity naměřené u jednotlivých kultivarů

Číslo vzorku	Název kultivaru	AChE (% inhibice) při [50 µg/ml]	IC ₅₀ AChE µg/ml	BuChE (% inhibice) při [50 µg/ml]	IC ₅₀ BuChE µg/ml
AL-720	BANANA SPLASH	78,08 ± 1,04	8,50 ± 0,50	39,35 ± 0,51	>25
AI-726	GENTLE GIANT	76,62 ± 1,21	11,76 ± 0,75	21,20 ± 1,05	>25
AL-731	LAS VEGAS	89,03 ± 1,45	4,13 ± 0,28	43,73 ± 1,17	>25
AL-732	LEMON BEAUTY	90,63 ± 0,85	4,19 ± 0,25	68,30 ± 0,60	21,24 ± 1,38
AL-735	MARY G. LIRETTE	32,91 ± 0,84	>25	21,60 ± 1,70	>25
AL-737	ORANGE PROGRESS	50,45 ± 1,01	>25	45,99 ± 1,81	>25
AL-741	PINK WONDER	7,84 ± 1,51	>25	70,12 ± 1,35	6,88 ± 0,40
Referenční látka					
Galanthamin HBr		100	0,74 ± 0,05	100	12,41 ± 0,98
Eserin		100	0,06 ± 0,00	100	0,08 ± 0,03
Huperzin A		100	0,01 ± 0,00	-	-

5.4 Alkaloidy izolované z kultivaru AL-735 - *Narcissus cv.*

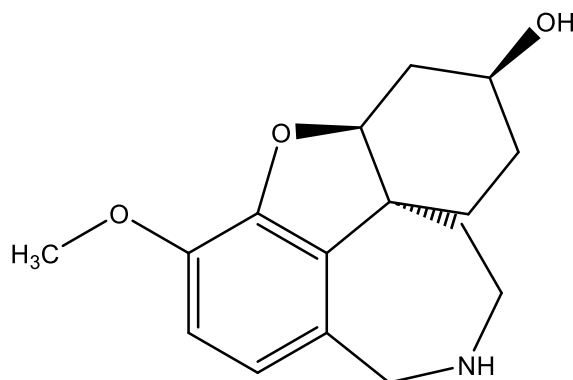
Mary G. Lirette

Na základě NMR analýzy byly ve vzorku AI-735 určeny následující alkaloidy.

Podfrakce č. 2

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu demethylykoramin

Sumární vzorec: C₁₆H₂₁NO₃



Molekulová hmotnost

Mr = 275,348

MS analýza

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

NMR analýza

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

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

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

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

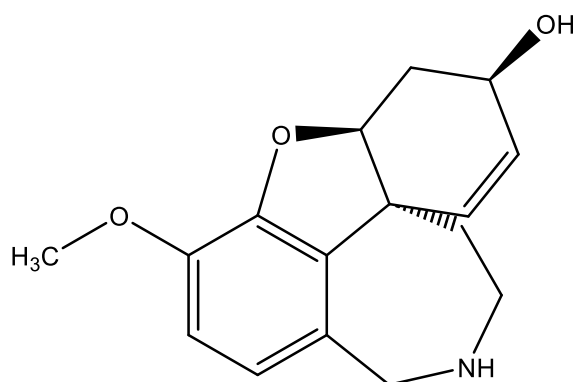
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -40^\circ$ ($c = 0,5$; CHCl_3)

Podfrakce č. 3

Látka byla určena jako alkaloid galanthaminového strukturního typu *N*-demethylgalanthamin = Epi-nor-galanthamin

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_4$



Molekulová hmotnost

$M_r = 273,332$

MS analýza

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

NMR analýza

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

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

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

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

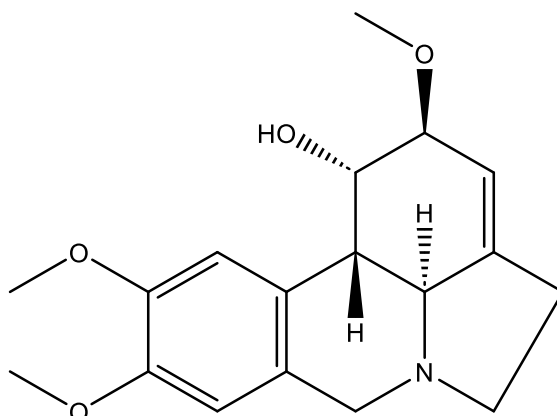
Optická otáčivost

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

Podfrakce č. 4

Látka byla určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu galanthin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 317,385

MS analýza

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

NMR analýza

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

4.66 (br, H-1), 3.76 (m, H-2), 5.61 (br, H-3), 2.64 (m, 2H-4), 2.35 (q, $J = 8.7$ Hz, H-5 α), 3.37 (m, H-5 β), 8.50 (d, $J = 14$ Hz, H-7 α), 4.17 (d, $J = 14$ Hz, H-7 β), 6.85 (s, H-8), 6.63 (s, H-11), 2.63 (m, H-11b), 2.74 (d, $J = 11.6$, H-11c), 3.90 (s, C-10 -OCH₃), 3.85 (s, C-9 -OCH₃), 3.52 (s, C-2 -OCH₃).

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

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

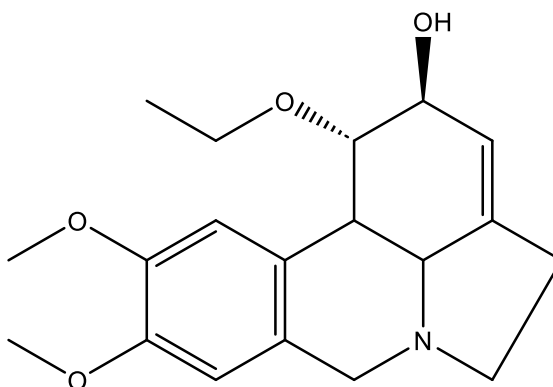
Optická otáčivost

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

Podfrakce č. 6

Látka byla určena jako alkaloid lykorinového strukturního typu acetylpluvin

Sumární vzorec: C₁₉H₂₃NO₄



Molekulová hmotnost

Mr = 329,4

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 329 (85), 328 (11), 270 (17), 269 (21), 268 (86), 254 (16), 252 (12), 243 (41), 242 (100).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ 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)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ 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 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 53.8 (C6), 43.4 (C15), 33.4 (C2), 28.6 (C5), 21.3 (CH₃)

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -82,7^\circ$ (c = 0,08; CHCl₃)

6 Diskuze a závěr

Alzheimerova choroba je závažné celosvětově rozšířené neurodegenerativní onemocnění, které představuje nejčastější příčinu demence a úmrtí.^{54,60} Přesné mechanismy etiopatogeneze nejsou zatím zcela známy. Tuto nemoc charakterizuje úbytek nervových buněk a mozkové tkáně a mezi typické znaky, které se vyskytují u tohoto onemocnění, patří tvorba a ukládání A β , deficit acetylcholinu a neurofibrilární shluky skládající se z *Tau* proteinu.⁴⁵ Onemocnění je velmi zrádné, protože se první příznaky mohou přisuzovat obyčejnému stárnutí. Pro pacienty s AN jsou typické výpadky paměti, na začátku nemoci se objevují stavy úzkosti, deprese. Spousta nemocných je bez jakékoli terapie, protože jim nemoc zatím nebyla diagnostikována. Na tuto nemoc bohužel zatím neexistuje lék, AN se dá pouze mírnit včasným prodloužením počátečních stádií. Symptomatická léčba je převážně směřována na iAChE a iBuChE. Intenzivní snahou mnoha výzkumných skupin je najít vhodné, účinné, kvalitní a bezpečné léčivé látky. Tato práce je zaměřena na hledání potenciálních inhibitorů AChE a BuChE mezi alkaloidy obsaženými v rodu *Narcissus* z čeledi Amaryllidaceae.

Náplní této diplomové práce bylo připravit sumární alkaloidní extrakty z cibulí 7 kultivarů rodu *Narcissus* sp., konkrétně byly využity kultivary *Narcissus* cv. Banana Splash, *Narcissus* cv. Gentle Giant, *Narcissus* cv. Las Vegas, *Narcissus* cv. Lemon Beauty, *Narcissus* cv. Mary G. Lirette, *Narcissus* cv. Orange Progress a *Narcissus* cv. Pink Wonder. Vyhodnocení předpokládaného složení extraktů bylo provedeno pomocí GC-MS analýzy a porovnávání spekter za využití knihovny EI-MS spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a souboru spekter látek, které již byly v minulosti v laboratoři izolovány. V extraktech byl nalezen pravděpodobný výskyt těchto 16 alkaloidů viz. tabulka č. 6: galanthamin, narvedin, *N*-demethylgalanthamin, lykoramin, demethyllykoramin (galanthaminový strukturní typ), pluvin, acetylpluvin, norpluvin, 1-*O*-acetyl-10-norpluvin, galanthin, lykorin, 9-*O*-methylpseudolykorin, narcissidin, assoanin (lykorinový strukturní typ), hippeastrin (homolykorinový strukturní typ), haemanthamin (haemanthaminový strukturní typ). Ve všech extraktech byla zjištěna přítomnost alkaloidu 9-*O*-methylpseudolykorinu a alkaloidy galanthin a pluvin se nacházely v 6 ze 7 měřených extraktů.

Inhibiční aktivita vůči humánní acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase byla zjišťována prostřednictvím Ellmanovy spektrofotometrické metody, DTNB a esterů

thiocholinu. Naměřené inhibiční aktivity kultivarů, které byly porovnány s referenčními látkami galanthaminem, eserinem a huperzinem A, jsou uvedeny v tabulce č.7. Poměrně vysoké inhibiční aktivity vůči AChE byly naměřeny u kultivarů AL-720, AL-726 AL-731, AL-732, přičemž nejvyšší procentuální schopnost inhibovat AChE při koncentraci 50 µg/ml byla naměřena u kultivarů Lemon Beauty (AL-732) s $IC_{50} 4,19 \pm 0,25$ a Las vegas (AL- 731) s $IC_{50} 4,13 \pm 0,28$. Tyto kultivary se přiblížily hodnotě referenční látky galanthaminu HBr nejvíce. Důvodem byl pravděpodobně obsah galanthaminu a *N*-demethylgalanthaminu. Tyto kultivary mohou sloužit jako vhodný zdroj izolace galantaminu. U extraktů AL-735, AL-737, AL-741 byly naměřeny nízké inhibiční aktivity vůči AChE. Předpokládaným důvodem je nepatrný nebo žádný obsah látek alkaloidní povahy galantaminového typu. Nejvyšší procentuální schopnost inhibovat BuChE při koncentraci 50 µg/ml byla naměřena u kultivaru Pink Wonder (AL-741) s $IC_{50} 6,88 \pm 0,40$, ve kterém byl zastoupen zejména galanthin. V menší míře se v tomto extraktu nacházel také β -krinanový alkaloid haemanthamin, který je využitelný pro své cytotoxické vlastnosti proti rozmanitému množství rakovinných buněčných linií. Kultivary AL-720, AL-726, AL-731 a AL-741 obsahovaly haemanthamin ve vyšším množství a mohly by tak sloužit jako zdroj tohoto alkaloidu, zatímco extrakty AL-720, AL-735 a AL-737 by se mohly využívat k izolaci alkaloidu galanthinu.

Pro další fytochemickou práci byl na základě GC/MS analýzy vybrán extrakt AL-735. Dle spektra tento extrakt obsahoval nejméně 7 alkaloidních látek, z nichž byl nejvíce zastoupen právě galanthin. Galanthin je díky své struktuře s jednou volnou OH skupinou velmi vhodný pro přípravu polosyntetických derivátů. Potenciální využití tohoto kultivaru k izolaci galanthinu byl hlavní důvod pro další zpracování.

Inspirací byly níže uvedené práce, ve kterých se tvorbou a účinky derivátů vytvořených ze struktury alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae zabývala např. R. Peřinová, N. Maafi, J. Korábečný et. al.: Functionalized aromatic esters of the amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease, ve které se ukázalo, že některé aromatické estery odvozené ze struktury hemanthaminového typu, vykazují podle studií poměrně silnou inhibiční aktivitu vůči AChE nebo BuChE. Zároveň bylo zkoumáno, zda dokáží projít přes hematoencefalickou bariéru. Tato schopnost je zcela nezbytná pro účinek potenciálního léčiva. Aromatické estery odvozené

od hemanthaminu lze považovat za zajímavé výchozí látky pro další vývoj léčiv použitelných v terapii AN.

Deriváty alkaloidu vittatinu se zabývala práce Al Shammari L., D. Hulcové, J. Maříkové et. al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* cv. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. Určité deriváty odvozené od vittatinu, alkaloidu haemanthaminového typu, vykazují aktivitu vůči AChE a BuChE. Např. 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatin a 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatin dokáží překonat hematoencefalickou bariéru a dostat se do cílových struktur v CNS. Ambellinem, alkaloidem krininového strukturního typu se zabývala práce D. Liu, Z. Zhou, H. Liu: The theoretical total synthesis of an aromatic esters of the crinane amaryllidaceae alkaloid ambelline, ve které se ambellin ukazuje s velmi slibnými biologickými vlastnostmi a potenciálem v léčbě AN.

Izolace alkaloidů z extraktu AL-735 proběhla za využití preparativní TLC. Analýza získaných čistých látek, k ověření jejich přítomnosti, proběhla pomocí fyzikálně-chemických metod, konkrétně byly alkaloidy podrobeny NMR analýze a měření optické otáčivosti polarimetrem. Separované alkaloidy byly zváženy a váhy byly zaznamenány do tabulky č. 5. Z extraktu se podařilo izolovat 4 čisté alkaloidy, které byly identifikované jako alkaloid galanthaminového strukturního typu demethyllykoramin, alkaloid galanthaminového strukturního typu *N*-demethylgalanthamin = Epi-nor-galanthamin, alkaloid lykorinového strukturního typu galanthin, alkaloid lykorinového strukturního typu acetylplavin.

Závěr diplomové práce je takový, že kultivary rodu *Narcissus* lze brát jako velmi bohatý zdroj amaryllkovitých alkaloidů, které se mohou využít např. k přípravě polosyntetických derivátů z nich odvozených. Alkaloidy jsou cenné díky schopnosti působit různými biologickými aktivitami např. mají specifické účinky proti rakovinotvorným buňkám, antimalarickou aktivitu, antivirotickou aktivitu a některé působí jako iAChE a BuChE. Kultivarům rodu *Narcissus* je vhodné se podrobněji věnovat i v dalších fytochemických studiích.

7 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Ústav: Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Řešitel: Zuzana Růžičková

Školitel: PharmDr. Daniela Suchánková, Ph.D.

Název práce: Screening biologické aktivity různých druhů rodu *Narcissus* sp. III

Klíčová slova: *Narcissus* sp., cibule, alkaloidní extrakty, GC/MS analýza, biologická aktivita, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa

Alzheimerova nemoc je závažným onemocněním, které je hlavní příčinou demence i smrti. Onemocnění je charakterizováno poklesem nervových buněk a mozkové tkáně. Pro pacienty s AN je typická ztráta paměti, v počátcích i úzkostné stavy a deprese. Hlavní příčinu tvoří formace a ukládání β -amyloidu a deficit neurotransmiteru acetylcholinu. Na AN bohužel zatím neexistuje žádný lék, dá se pouze zmírnit prodloužením mírných stádií nemoci. Léčba je převážně směřována na inhibitory acetylcholinesterasy, aby byl eliminován nedostatek acetylcholinu.

Hlavním cílem diplomové práce bylo získat sumární alkaloidní extrakty z cibulí 7 kultivarů rodu *Narcissus* sp., které by mohly sloužit jako potenciální zdroj látek pro léčbu AN. Konkrétně se jednalo o *Narcissus* cv. Banana Splash, *Narcissus* cv. Gentle Giant, *Narcissus* cv. Las Vegas, *Narcissus* cv. Lemon Beauty, *Narcissus* cv. Mary G. Lirette, *Narcissus* cv. Orange Progress a *Narcissus* cv. Pink Wonder. Výskyt alkaloidů v připravených extraktech byl následně vyhodnocen pomocí GS/MS analýzy. U všech extraktů byl dále stanoven inhibiční potenciál vůči lidským cholinesterasám, kde nejzajímavější výsledky byly zaznamenány u kultivarů AL-731 a AL-732 pro inhibici AChE a u AL-741 pro inhibici BuChE. Na základě GC/MS analýzy byl dále vybrán kultivar AL-735 pro izolaci čistých látek a zejména alkaloidu galanthinu, který má potenciál pro přípravu polosyntetických derivátů. Z tohoto extraktu se podařilo izolovat 4 čisté alkaloidy, které na základě NMR analýzy byly identifikované jako demethyllykoramin, epi-nor-galanthamin, galanthin, acetylpluvin.

8 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical botany

Author: Zuzana Růžičková

Supervisor: PharmDr. Daniela Suchánková, Ph.D.

Title of thesis: Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus* sp. III

Key words: *Narcissus* sp., bulbs, alkaloidal extracts, GC/MS analysis, biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

Alzheimer's disease is a severe disease that represents the most common cause of dementia and death. The disease is characterized by a decrease of nerve cells and brain tissue. For patients with Alzheimer's disease, memory lapses are typical, at the beginning of the disease states of anxiety and depression occur. The main cause is the formation and deposition of β -amyloid and deficit of the neurotransmitter acetylcholine. Unfortunately, we do not know how to cure the Alzheimer's disease, but we can significantly slow it down by prolonging the mild stages of the disease. Treatment is mainly directed to AChE inhibitors to eliminate ACh deficiency.

The main goal of this diploma thesis was to obtain summary alkaloid extracts from bulbs of seven cultivars of the genus *Narcissus* sp., which could have been a potential source of substances for the treatment of Alzheimer's disease. Cultivars were specifically *Narcissus* cv. Banana Splash, *Narcissus* cv. Gentle Giant, *Narcissus* cv. Las Vegas, *Narcissus* cv. Lemon Beauty, *Narcissus* cv. Mary G. Lirette, *Narcissus* cv. Orange Progress and *Narcissus* cv. Pink Wonder. The occurrence of alkaloids in prepared extracts was subsequently evaluated by using GC-MS analysis. Then the inhibitory activity against human cholinesterases was determined for all extracts and the most interesting results were observed in cultivars AL-731 and AL-732 against AChE and in cultivar AL-741 against BuChE. Based on GC/MS analysis, the cultivar AL-735 was selected for the isolation of pure substances and especially alkaloid galanthamine, which has the potential for the preparation of semi-synthetic derivatives. From this extract managed to isolate 4 pure alkaloids, which were identified as demethyllycoramine, epi-nor-galanthamine, galanthine and acetylpluvine based on NMR analysis.

9 Seznam použité literatury

- ¹Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., Havelek R.: The biological activity of alkaloids from the amaryllidaceae: From cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications*. 2016, 11, 1587-1594.
- ²Maomao H., Chunrong Q., Oude G., Xianming H., Xuechuan H.: Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *The Royal Society of Chemistry*. 2015, 5, 16562-16574.
- ³Jahodář L.: *Farmakobotanika*. Praha, Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
- ⁴Cahlíková L., Breiterová K., Opletal L.: Chemistry and biological activity of alkaloids from the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). *Molecules*. 2020, 25, 4797.
- ⁵Koutová D., Maafi N., Havelek R. et. al.: Chemical and biological aspects of montanine-type alkaloids isolated from plants of the amaryllidaceae family. *Molecules*. 2020, 25, 2337.
- ⁶Spilková J.: *Farmakognozie*. Praha, Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
- ⁷Korábečný J., Soukup O., Vališ M. a kolektiv: *Alzheimerova nemoc*. Praha, Maxdorf, 2020. ISBN 978-80-7345-643-6.
- ⁸Bryan J. E.: *Kapesní atlas cibuloviny*. Praha, Knižní klub, 2010. ISBN 978-80-242-2716-0.
- ⁹Petrová E.: *Pěstujeme okrasné cibuloviny*. Praha, Brázda, 2005. ISBN 978-80-209-0335-8.
- ¹⁰Kaplan Z.: *Klíč ke květeně České republiky*. Praha, Academia, 2019. ISBN 978-80-200-2660-6.
- ¹¹Hanks G. R.: *The biology of narcissus and daffodil*. Londýn, CRC Press, 2002. ISBN 978-04-292-1888-0.
- ¹²<http://alpines.dk/gallery/plants/n/narcissus-viridiflorus/> (staženo 17.10.2022)
- ¹³<https://kertlap.hu/narciszok/> (staženo 17.10.2022)
- ¹⁴<http://tulipany.info/narcisy/druhy-a-odrudy-narcisy/zahradni-narcisy/kratkokorunne-narcisy/> (staženo 17.10.2022)
- ¹⁵<https://order.eurobulb.nl/narcissus-split-corona-daffodils/3301-narcissus-dolly-mollinger-3301.html> (staženo 19.10.2022)
- ¹⁶<https://www.peternyssen.com/nl/baby-moon.html> (staženo 19.10.2022)
- ¹⁷<https://www.peternyssen.com/nl/actaea.html> (staženo 19.10.2022)
- ¹⁸https://www.brecks.com/product/banana-splash-daffodil/fall_sale (staženo 16.9.2022)
- ¹⁹<https://garden.org/plants/view/790507/Daffodil-Narcissus-Banana-Splash/> (staženo 19.9.2022)

- ²⁰<https://gardenseedsmarket.com/narcis-narcis-banana-splash-velke-baleni-50-ks.html>
(staženo 19.9.2022)
- ²¹<https://www.whiteflowerfarm.com/narcissus-gentle-giant> (staženo 16.9.2022)
- ²²<https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Gentle%20Giant&pagenum1=1&which=hist1>
(staženo 19.9.2022)
- ²³<https://www.farmergracy.co.uk/products/narcissus-las-vegas-bulbs-uk> (staženo 16.9.2022)
- ²⁴<https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Las+Vegas> (staženo 19.9.2022)
- ²⁵<https://www.vanengelen.com/narcissus-las-vegas.html> (staženo 19.9.2022)
- ²⁶<https://www.jparkers.co.uk/narcissi-lemon-beauty-1214cm-collection-1>(staženo 19.9.2022)
- ²⁷<https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Lemon+Beauty> (staženo 19.9.2022)
- ²⁸<https://www.dutchbulbs.co.uk/plant-0000219-pe-1/narcissi-lemon-beauty/>(staženo 19.9.2022)
- ²⁹<https://www.colorblends.com/wholesale/daffodils/mary-gay-lirette/> (staženo 16.9.2022)
- ³⁰<https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Mary+Gay+Lirette> (staženo 19.9.2022)
- ³¹<http://www.lukon-glads.com/narcis-mary-g.-lirette-p-5310> (staženo 24.9.2022)
- ³²https://www.dutchbulbs.com/product/_Orange_Progress_Trumpet_Daffodil (staženo 16.9.2022)
- ³³<https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Orange+Progress> (staženo 19.9.2022)
- ³⁴<https://shop.floretflowers.com/products/narcissus-pink-wonder> (staženo 16.9.2022)
- ³⁵<https://www.vanengelen.com/flower-bulbs-index/narcissi/split-cup/narcissus-pink-wonder.html> (staženo 19.9.2022)
- ³⁶<https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Pink%20Wonder&pagenum1=1&which=hist1>
(staženo 19.9.2022)
- ³⁷Cordell G. A.: *The alkaloids*. San Diego, Academic press. 1998. ISBN: 0-12-469551-5.
- ³⁸Kilgore M. B., Kutchan T. M.: The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme Discovery. *Phytochemistry reviews*. 2016, 15, 317-337.
- ³⁹Maříková J., Ritomská A., Korábečný J. et. al.: Aromatic esters of the crinane amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of natural products*. 2020, 83, 1359-1367.

- ⁴⁰Takos A.M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14, 11713-11741.
- ⁴¹Dalecka M., Královec K., Havelek R., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2013, 107, 701-708.
- ⁴²Khalifa M.F., Attia E.Z., Fahim J.R., Kamel M.S.: An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal Of Advanced Biomedical And Pharmaceutical Sciences*. 2018, 1, 41-49.
- ⁴³Şener B., Orhan I., Satayavivad J.: Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from amaryllidaceae. *Phytotherapy research*. 2003, 17, 1220-1223.
- ⁴⁴Cahlíková L., Kawano I., Řezáčová M., Blunden G., Hulcová D., Havelek R.: The amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Springer nature*. 2021, 20, 303-323.
- ⁴⁵Peřinová R., Maafi N., Korábečný J. et.al.: Functionalized aromatic esters of the amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorganic chemistry*. 2020, 100, 103928.
- ⁴⁶Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J. et.al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* cv. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *South African Journal of Botany*. 2021, 136, 137-146.
- ⁴⁷Liu D., Zhou Z., Liu H.: The theoretical total synthesis of an aromatic esters of the crinane amaryllidaceae alkaloid ambelline. *Web of conferences*. 2021, 267, 02011.
- ⁴⁸Breiterová K., Ritomská A., Fontinha D. et. al.: Derivates of amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of hepatic stage of Plasmodium berghei infection in vitro. *Pharmaceutics*. 2023, 15, 1007.
- ⁴⁹Danishefsky S., Lee J.Y.: Total synthesis of (±)-pancratistatin. *American chemical society*. 1989, 111, 4829-4837.
- ⁵⁰Kornienko A., Rvidente A.: Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *American Chemical Society. Chemical reviews*. 2008, 108, 1982-2014

- ⁵¹Ingrassia L., Lefranc F., Dewelle J., Pottier L., Mathieu V. et. al.: Structure-activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an amaryllidaceae isocarbostryl derivative) as potential anticancer agents. *American chemical society*. 2009, 52, 1100-1114.
- ⁵²Rigby H. J., Cavezza A., Heeg J. M.: Total synthesis of (±)-Tazettine. *American chemical society*. 198, 120, 3664-3670.
- ⁵³Cimmino A., Masi M., Evidente M. et. al.: Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality*. 2017, 29, 486-499.
- ⁵⁴Franková V.: Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství. Psychiatrie pro praxi*. 2015, 16, 79–82.
- ⁵⁵Lane C. A., Hardy J., Schott J. M.: Alzheimer's disease. *European journal of neurology*. 2018, 25, 59–70.
- ⁵⁶Zvěřová M.: *Alzheimerova demence*. Praha, Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0561-8.
- ⁵⁷Jirák R., Obenberger J., Preiss M.: *Alzheimerova choroba*. Praha, Maxdorf, 1998. ISBN 80-85800-88-8.
- ⁵⁸Jirák R., Holmerová I., Borzová C. a kolektiv: *Demence a jiné poruchy paměti. Komunikace a každodenní péče*. Praha, Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2454-6.
- ⁵⁹Jirák R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*. 2008, 9, 240-244.
- ⁶⁰Lane C. A., Hardy J., Schott J. M.: Alzheimer's disease. *European journal of neurology*. 2018, 25, 59–70.
- ⁶¹Koukolík F., Jirák R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha, Grada, 1998. ISBN: 80-7169-615-3.
- ⁶²Jirák R., Manukyan A.: Hledání farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská Psychiatrie*. 2017, 113, 79-83.
- ⁶³<https://www.medpagetoday.com/neurology/alzheimersdisease/84155> (staženo 11.6.2022)
- ⁶⁴Nizynski B., Dzwolak W., Nieznanski K.: Amyloidogenesis of *Tau* protein. *The protein society*. 2017, 26, 2126-2150.
- ⁶⁵Verma S., Kumar A., Tripathi T., Kumar A.: Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists: current scenario in Alzheimer's disease therapy. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2018, 70, 985-993.

- ⁶⁶Nguyen L., Rigo J.M., Rocher V., Belachew S. et. al.: Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell tissue res.* 2001, 305, 187-202.
- ⁶⁷Parihar M.S., Hemnani T.: Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience.* 2004, 11, 456-467.
- ⁶⁸Jiráček R., Manukyan A.: Hledání farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská Psychiatrie.* 2017, 113, 79-83.
- ⁶⁹Čechová L., Bartoš A., Doležil D., Řípková D.: Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi,* 2011, 12, 175-180.
- ⁷⁰Brejčich Z., Karaman R.: Comprehensive review on alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules.* 2020, 25, 5789.
- ⁷¹Oken B.S., Storzbach D.M., Kaye J. A.: The efficacy of ginkgo biloba on cognitive function in alzheimer disease. *American Medical Association.* 1998, 55, 1409-1415.
- ⁷²<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:262125-1> (staženo 15.3.2023)
- ⁷³Massoud F., Léger G.: Pharmacological treatment of alzheimer disease. *The Canadian Journal of Psychiatry.* 2011, 56, 579-588.
- ⁷⁴Walsh S., Merrick R., Milne R., Brayne C.: Adacatumab for alzheimer's disease? *The BMJ.* 2021, 374, 1682.
- ⁷⁵Egan M. F., Kost J., Voss T., Mukai Y., Aisen S.P., et. al.: Randomized trial of verubecestat for prodromal alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine.* 2019, 380, 1408-1420.