

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE
ALKALOIDY DŘEVA DRUHU *LIRIODENDRON TULIPIFERA* L. A JEJICH AKTIVITA VŮČI LIDSKÝM
CHOLINESTERASAM

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

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

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především své školitelce PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za veškerou pomoc, odborné rady a ochotu během vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za přípravu alkaloidního extraktu a za změření inhibiční aktivity cholinesteras. Můj dík patří i doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter, Mgr. Martině Hrabinové a doc. PharmDr. Danielovi Junovi, Ph.D. z Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za stanovení inhibiční aktivity vůči propyl oligopeptidase a celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za pomoc a příjemné pracovní prostředí.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, 2018

Magda Hrušková

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍL PRÁCE.....	3
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	4
3.1	Alzheimerova choroba	4
3.1.1	Epidemiologie.....	4
3.1.2	Formy AD.....	4
3.1.3	Etiopatogeneze.....	5
3.1.4	Příznaky	9
3.1.5	Diagnóza	10
3.1.6	Rizikové faktory	10
3.1.7	Farmakoterapie	10
3.2	<i>Liriodendron tulipifera</i> L. – liliovník tulipánokvětý.....	17
3.2.1	Taxonomické zařazení [42].....	17
3.2.2	Botanická charakteristika	17
3.2.3	Morfologický popis.....	18
3.2.4	Nároky na prostředí.....	18
3.2.5	Využití liliovníku v etnomedicíně	18
3.2.6	Obsahové látky	19
3.2.7	Obsah alkaloidů	19
3.2.8	Biologická aktivita alkaloidů	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Materiál a přístrojové vybavení	27
4.1.1	Chemikálie	27
4.1.2	Rozpouštědla	27
4.1.3	Pufry	28

4.1.4	Absorbenty pro chromatografii.....	28
4.1.5	Pomocný materiál	28
4.1.6	Přístroje	29
4.1.7	Vyvíjecí soustavy pro TLC	29
4.1.8	Detekční činidla	30
4.1.9	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE	30
4.1.10	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP	30
4.2	Metody	31
4.2.1	Obecné postupy	31
4.2.2	Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností	33
4.2.3	Stanovení biologické aktivity.....	34
4.3	Izolace alkaloidů ze dřeva <i>Liriodendron tulipifera</i> L.	36
4.3.1	Příprava alkaloidního extraktu	36
4.3.2	Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu	38
4.3.3	Izolace alkaloidů z frakce č. 79–94	39
5	VÝSLEDKY.....	41
5.1	Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných alkaloidů	41
5.1.1	LT01: Liriodenin	41
5.1.2	LT02: (+)-Norglaucin	42
5.1.3	LT03 + LT04: (-)-Pallidin	43
5.2	Inhibiční aktivita alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP	44
6	DISKUZE	45
7	ABSTRAKT	47
8	ABSTRACT	48
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitory acetylcholinesterasy
AD	Alzheimer's disease = Alzheimerova choroba
ADINACO	Alzheimer's Disease and NATural COmpounds
AK	aminokyselina
AMPK	adenosin monofostát-aktivovaná protein kinasa
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
ASA	kyselina acetylsalicylová
β A	β amyloid
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DS	Downův syndrom
GIT	gastrointestinální
HEB	hematoencefalická bariera
HLA	Human Leucocyte Antigen = hlavní histokompatibilní komplex
ChE	cholinesterasy
ChEI	inhibitory cholinesteras
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-asparagová kyselina
NSAID	nesteroidní antiflogistika
POP	propyl oligopeptidasa
RF	rizikový faktor
Rf	retenční faktor
SNRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
WHO	World Health Organization = Světová zdravotnická organizace

PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Rivastigmin	11
Obrázek 2 Galantamin	11
Obrázek 3 Donepezil	12
Obrázek 4 Huperzin A.....	12
Obrázek 5 Takrin.....	12
Obrázek 6 Memantin.....	13
Obrázek 7 <i>Liriodendron tulipifera</i> L. [41]	17
Obrázek 8 Aporfinové alkaloidy	20
Obrázek 9 Aporfinové alkaloidy substituované methyldioxy- skupinou	21
Obrázek 10 Oxoaporfinové alkaloidy	21
Obrázek 11 Oxoaporfinové alkaloidy substituované methyldioxy- skupinou	21
Obrázek 12 Kvarterní oxoaporfinové alkaloidy	21
Obrázek 13 Dehydroaporfinové alkaloidy.....	22
Obrázek 14 Dehydroglaucin	22
Obrázek 15 Glaziovin.....	22
Obrázek 16 Tetrahydroprotoberinový typ	22
Obrázek 17 Kadaverin	23
Obrázek 18 Sumární alkaloidní chloroformový výtřepek <i>Liriodendron tulipifera</i> L.....	37
Obrázek 19 Přечиštěné alkaloidní etherové a chloroformové výtřečky <i>Liriodendron tulipifera</i> L.....	38
Obrázek 20 Liriodenin	41
Obrázek 21 (+)-Norglaucin	42
Obrázek 22 (-)-Pallidin.....	43
Tabulka 1 Naměřené hodnoty inhibiční aktivity IC ₅₀ alkaloidních extraktů liliovníku tulipánokvětého	2
Tabulka 2 Inhibiční aktivita alkaloidů izolovaných z liliovníku vůči AChE a BuChE	24
Tabulka 3 Výsledné souhrnné frakce sloupcové chromatografie	39
Tabulka 4 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů	44

1 ÚVOD

Lidé využívají rostliny nejen jako zdroj základních živin, produktů primárního metabolismu, ale také pro obsah sekundárních metabolitů, látek, které plní v rostlinách řadu funkcí a často se jejich obsah liší od taxonu. Obecně pomáhají sekundární metabolity rostlinám zvýšit šanci na přežití, jsou využívány k ochraně proti škůdcům a nemocem nebo se mohou uplatňovat během rozmnožování a také při regulaci metabolismu.

Pro farmacii mají sekundární metabolity zásadní význam. Jejich účinků na lidské zdraví ve smyslu léčby nebo prevence nemocí bylo hojně využíváno již v tradiční medicíně a své uplatnění nacházejí i nyní. Řada těchto látek má ale i nežádoucí až toxické účinky, které jsou impulsem k hlubšímu studiu. V potravinářství jsou hladiny těchto látek limitovány a kontrolovány (např. pyrrolizidinové alkaloidy), ve farmacii mohou sloužit jako léčiva (např. paklitaxel – chemoterapeutikum).

Látky rostlinného původu našly uplatnění mimo jiné i jako kognitiva, léčiva zlepšující kognitivní funkce (paměť, učení, vnímání), které se používají jako léčiva ovlivňující Alzheimerovu chorobu (AD). U tohoto chronického onemocnění lze zatím pouze zpomalovat jeho průběh a zlepšovat kvalitu života pacientů. Spektrum používaných léčiv k ovlivnění průběhu AD je poměrně úzké, proto se stále hledají nová léčiva. Jedním z jejich zdrojů jsou i rostliny, které obsahují nepřeberné množství látek s nejrůznější biologickou aktivitou a mohly by tak zasáhnout do různých patofyziologických pochodů uplatňujících se v průběhu AD.

Lidské cholinesterasy (ChE) jsou enzymy, které odbourávají neurotransmitter acetylcholin (ACh). Inhibitorů těchto enzymů se využívá u nemocných s Alzheimerovou chorobou, ale i u jiných typů demencí, neboť právě u těchto nemocí je prokázán deficit ACh. Zvyšuje se tak jeho dostupnost v neuronální štěrbině a upravuje se cholinergní transmise na nervových synapsích v centrální nervové soustavě (CNS). Inhibitory cholinesteras (ChEI) též snižují toxicitu i tvorbu β amyloidu (β A), čímž zasahují do neurodegenerativních mechanismů (patogeneze) AD, jejich působení je tak komplexní [1].

Léčiva patřící do skupiny ChEI jsou přírodní i syntetická. Zástupce galantamin, alkaloid sněženky podsněžníku (*Galanthus nivalis* L.) [2], patří do velmi významné čeledi jednoděložných Amaryllidaceae. U alkaloidů této čeledi byla prokázána vysoká úroveň inhibiční aktivity vůči ChE [3]. Významný inhibiční efekt byl však prokázán i u některých dvouděložných rostlin, např. u isochinolinových alkaloidů z čeledi Lauraceae [4].

Tato diplomová práce byla zpracována na Katedře farmaceutické botaniky v rámci výzkumné skupiny ADINACO, která se zabývá studiem sekundárních metabolitů rostlin, které je zaměřeno na hledání látek potenciálně využitelných v terapii AD a na látky s protinádorovou aktivitou.

Díky obsahu isochinolinových alkaloidů [5] byly alkaloidní extrakty z liliovníku tulipánokvětého (*Liriodendron tulipifera* L.) z čeledi Magnoliaceae předběžně testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským ChE (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Naměřené hodnoty inhibiční aktivity IC₅₀ alkaloidních extraktů liliovníku tulipánokvětého

Číslo	Taxon	Morfologická část	Datum sběru	EtOAc extrakty – alkaloidy (IC ₅₀ µg/ml)	
				AChE	BuChE
AL-013	<i>Liriodendron tulipifera</i>	dřevo	červenec – srpen 2015	342,91 ± 31,95	65,01 ± 5,94
AL-198	<i>Liriodendron tulipifera</i>	větvička bez listů	duben 2010	544,72 ± 51,08	105,83 ± 9,14
AL-582	<i>Liriodendron tulipifera</i>	dřevo větví	květen 2015	300,3 ± 44,71	45,27 ± 4,54

Inhibiční potenciál extraktů nebyl příliš vysoký, ale i přesto byl alkaloidní extrakt ze dřeva liliovníku vybrán pro izolaci a identifikaci isochinolinových alkaloidů, zejména pro sledování vztahu struktury a účinku, což spadá do konceptu dlouhodobé práce vědecké skupiny ADINACO.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo izolovat alkaloidy ze dřeva liliovníku tulipánokvětého a stanovit vliv těchto látek na lidské cholinesterasy pomocí:

- zpracování literární rešerše
- výběru vhodných metod pro izolaci alkaloidů
- vlastní izolační práce
- stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek
- vyhodnocení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám a vůči propyl oligopeptidase.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je primární neurodegenerativní onemocnění, u některých pacientů známé etiologie (např. porucha na některých genech), celkově ale etiologie této nemoci zatím objasněna není. Toto onemocnění je diagnostikováno v 50–60 % případů všech demencí, z čehož plyne, že se jedná o nejčastěji se vyskytující typ demence. Postihuje parietotemporální oblast kůry mozku [1]. Nejčastěji je charakterizováno progresivní ztrátou kognitivních funkcí, může progredovat až do stádia, kdy pacient není schopný postarat se sám o sebe. Někteří pacienti také trpí depresi, paranoiou či halucinacemi. Tato choroba je smrtelná, v současnosti je možné pouze zmírňovat její příznaky a zpomalovat její průběh [6].

3.1.1 Epidemiologie

Celosvětově se prevalence (tj. počet případů v populaci) všech typů demencí podle WHO pohybuje okolo 50 mil. a je sedmou hlavní příčinou úmrtí [7]. Prevalence roste s věkem, u osob nad 65 let je 5–8 %, nad 75 let se pohybuje mezi 15–20 % a ve věku nad 85 let tvoří až 50 %. Vyšší prevalence je u ženského pohlaví, což může být způsobeno i tím, že se ženy dožívají průměrně vyššího věku, avšak přesná příčina vyšší prevalence u žen zatím známa není [8].

V České republice trpí různými typy demence kolem 150 000 lidí, z toho více než dvě třetiny tvoří ženy. Odhady jsou takové, že v roce 2050 by prevalence mohla narůst až na 383 000 nemocných, protože se jejich počet neustále exponenciálně zvyšuje [9].

3.1.2 Formy AD

AD je heterogenní onemocnění. Fenotypicky se rozlišují dvě různé podoby tohoto onemocnění: raná a pozdní forma. Raná forma začíná ve věku do šedesáti let a probíhá šest až osm let a je podmíněna genovými poruchami na chromozomu 21 (gen pro amyloidový prekurzorový protein (APP)), 14 (gen pro presenilin 1) a chromozomu 1 (gen pro presenilin 2). Oproti tomu pozdní forma začíná déle (ve věku nad 60 let), má většinou delší průběh (více než 10 let) a souvisí s genem pro apolipoprotein E (ApoE) na 19. chromozomu [10]. V novějších

genomových studiích bylo nalezeno více než deset oblastí v genech, které by mohly ovlivnit riziko spojené s výskytem AD [11].

3.1.3 Etiopatogeneze

Konkrétní příčina této nemoci doposud zjištěna nebyla, existuje více teorií, mezi hlavní patří cholinerní, amyloidní a teorie τ -proteinu. Při AD jsou pozorovatelné makroskopické a mikroskopické patogenetické změny na kůře mozku [9].

Makroskopické změny: snižuje se tloušťka mozkové kůry, rozšiřují se mozkové komory, zmenšuje se hmotnost i velikost mozku. Tyto jevy můžeme pozorovat i během fyziologického stárnutí mozku, rozdíl je však v tom, že u AD bývá postižení větší, zejména u presenilního typu AD, kdy pozorujeme globální atrofii mozku. Pro pozdní formu je charakteristická atrofie temporálního laloku [10].

Mezi mikroskopické změny patří úbytek neuronů, který je charakteristický i pro fyziologické stárnutí. Fyziologický ale není počet atrofovaných neuronů v kůře i podkorových oblastech, někdy dochází až k 40–78% poklesu. S hloubkou postižení kognitivních funkcí a atrofií neuronů koreluje i množství β A v hipokampu. Nejvíce postiženy jsou velké neurony a cholinerní neurony (bazálního telencefala). Atrofie cholinerních neuronů je retrogradní a úměrná postižení kůry [10].

Mezi další patří změny dendritické, mohou být progresivní i regresivní. Dále numericky atrofuje synapse (více v čelní kůře). Poškození synapsí v kůře odpovídá míře poškození kognitivních funkcí, v hipokampu potom koreluje s poškozením paměti [10].

3.1.3.1 Změny v cholinerním systému

Cholinerní synapse se nacházejí jak v centrálním, tak i v periferním nervovém systému. V presynaptickém zakončení neuronu se syntetizuje, skladuje a uvolňuje ACh. Na postsynaptické části se nacházejí acetylcholinové receptory, které jsou dvojího druhu, ionotropní nikotinové a muskarinové, spřažené s G-proteinem. Tyto receptory zprostředkovávají odpověď na uvolněný ACh. ACh je syntetizován v cytoplasmě cholinerních zakončení pomocí cholinacetyltransferasy z cholinu a acetylkoenzymu A. Je zde přítomen váčkový transportér, který přenáší výměnou za dva protony syntetizovaný ACh do synaptických váčků, kde je skladován. Po depolarizaci je ACh uvolněn z vezikul

do synaptické štěrby. Pro správnou funkci synapsí je nezbytná přítomnost enzymů acetylcholinesterasy (AChE) nebo butyrylcholinesterasy (BuChE), které hydrolyzují ACh na cholin a acetát, a ukončují tak působení mediátoru. Majoritně se uplatňuje AChE. Cholin je z extracelulární tekutiny vychytáván zpět do cholinergních zakončení pomocí cholinového přenašeče [12].

Během AD bývá postižen celý cholinergní systém: ubývá neuromediátoru ACh, cholinacetyltransferasy i AChE. Hladina BuChE naopak progresivně a významně stoupá, proto je také cílem léčby AD [13].

3.1.3.2 Senilní plaky

Senilní plaky jsou okrouhlé útvary obsahující β A. U AD je pozorován vyšší počet plaků, než je tomu u fyziologického stárnutí mozku. Stejně tak je nutné odlišovat výskyt neuritických plaků v mozkové kůře, který je přímo úměrný poškození kognitivních funkcí od non-neuritických plaků, které doprovázejí stárnutí [10].

3.1.3.3 β amyloid

Amyloid β neboli β amyloidní protein má sekundární strukturu podobnou β skládanému listu. Chronické ukládání tohoto vláknitého proteinu může být extracelulární i intracelulární. Tento protein tvoří 39–43 aminokyselin (AK), ukládá se v jádrech senilních plaků a ve stěnách drobných tepen. Vzniká z podstatně větších prekurzorů, které se souhrnně nazývají APP [10]. Fyziologicky se APP štěpí α -sekretasou na rozpustné fragmenty (do velikosti 39 AK), u AD dochází ke štěpení APP ve větší míře enzymy β -sekretasou a γ -sekretasou, což vede k ukládání nerozpustného β A. β A je degradován neprilysinem, hlavním enzymem odbourávajícím tento nerozpustný protein. U zdravých jedinců je mezi enzymy, které produkují a degradují tento protein rovnováha, nerovnováha vede ke kumulaci β A [14]. Fyziologicky se β A podílí na regulaci růstu neuritů. β A 40 se účastní až pozdního vývoje nemoci, raných fází se účastní β A 42, který je hlavní složkou β A senilních plaků, jeho množství se zvyšuje u všech forem AD [10].

3.1.3.4 Neuronální klubka

Neuronální klubka představují u AD změny na neurofibrilech (vlákna v neuronech). Podstatnou součástí těchto klubek je τ -protein [6]. Za fyziologického stavu se tento protein váže na mikrotubuly, které tak zpevňuje, a je defosforylovaný nebo fosforylovaný pouze zčásti. Za patologického stavu se zvyšuje počet nenačápaného proteinu, jeho koncentrace v cytosolu je tedy zvýšená a zvyšuje se pravděpodobnost, že dojde k jeho agregaci a fibrilizaci [9].

Dále jsou za patologických podmínek z konce τ -proteinu odštěpovány AK a dochází tím k hyperfosforylaci, což vede k jeho rozvláknění a následnému spojení těchto vláken v párově heliakální filamenta. Intracelulární depozice neuronálních klubek narušuje stavbu buňky a může tím způsobovat její smrt [9]. Hyperfosforylace může nastat kvůli hyperaktivitě kinas, které jsou odpovědné za fosforylaci, nebo díky nízké aktivitě fosfatas (defosforylují τ -protein) [6]. Na vzniku klubek se může podílet i glykosylace a ubiquitinizace [10].

3.1.3.5 Apolipoprotein E

ApoE je protein tvořený 299 AK, je součástí několika plazmatických lipoproteinů a podílí se na redistribuci lipidů mezi buňkami. Gen pro ApoE je polymorfní, vyskytuje se ve třech alelách, které kódují odpovídající izoformy (ApoE 2, ApoE 3, ApoE 4). ApoE 4 se vyskytuje u lidí trpících AD s větší frekvencí oproti normální populaci. Navíc lidé, kteří jsou homozygoti v alelách ApoE 4, jsou mnohem více ohroženi rizikem rozvoje pozdní formy AD než heterozygoti nebo lidé, kteří nositeli této alely nejsou. Nosičství alely ApoE 4 je tedy významným rizikovým faktorem vzniku této nemoci a tito lidé onemocní v mladším věku než heterozygoti nebo lidé, kteří nosiči alely nejsou [10]. Bylo však zjištěno, že u některých nigerijských populací výskyt alely ApoE 4 není spojen s výskytem AD, jako tomu je u jiných lidských populací. Může to být způsobeno genetickými rozdíly, environmentálními faktory nebo jejich interakcí [15].

Dále se v souvislosti s ApoE 4 např. prokázala vyšší rozvinutost senilních plaků než u ostatních izoform [16]. Kromě ApoE 4 se u ostatních izoform projevuje schopnost obnovy neuronů. ApoE 2 souvisí s nižší prevalencí AD [17].

3.1.3.6 Gliové buňky, zánětlivé mechanismy a oxidativní stres

Proliferované a aktivované mikroglie jsou buňky imunitních dějů, které mají schopnost fagocytace a jsou součástí monocyto-makrofágového systému. Během poškození CNS se zvětšují a migrují k místu poškození, při AD se v mozku koncentrují kolem senilních plaků. Objevuje se stále více důkazů, že mikroglie chrání proti výskytu AD. Na druhé straně je mnoho důkazů o tom, že jsou aktivované mikroglie pro neurony škodlivé. Mikroglie mohou způsobovat ztrátu synapsí jejich pohlcením, pravděpodobně prostřednictvím mechanismu závislém na komplementu. Také mohou zhoršovat patologii τ -proteinu a vylučovat zánětlivé mediátory, které mohou poškodit neurony přímo nebo prostřednictvím aktivace neurotoxických astrocytů, které se podílejí na zániku synapse [18].

Aktivované mikroglie se vyznačují vysokou mírou exprese HLA (Human Leucocyte Antigen) molekul v blízkosti depozit β A, což svědčí o jejich aktivitě. HLA jsou glykoproteiny umístěné na vnějším povrchu plazmatické membrány buněk, které mají roli antigenů a jsou kódovány geny, které tyto povrchové molekuly determinují. V mikroglíích můžeme také najít vysoký počet C3 a C1q složek komplementu nebo interleukinu 1 (IL 1). Jestliže se k mikroglíím přidá β A, začnou vylučovat $\text{TNF}\alpha$ a oxid dusnatý. Tuto aktivaci blokuje pouze ApoE 3, ApoE 4 nikoliv. Kolem plaků se tedy objevují nahromaděné mikroglie, které jsou jinak v mozku rozptýlené. Čím více se v mozku nachází ApoE 4, tím více se mikroglie okolo plaků hromadí [10].

IL 1, jako jedna z klíčových molekul imunitního systému, stimuluje kromě složek zánětu (C3 složky komplementu, astrocyty – ty stimuluje růst neuritů) i syntézu APP a ApoE 3. Při AD se také vyskytuje IL 6, mediátor zánětu, který u zdravých jedinců nenacházíme. Zde nachází význam léčba NSAID, která tlumí jeho syntézu [10]. V poslední době se o účinku NSAID polemizuje, některé studie potvrdily jejich protektivní a preventivní účinek, jiné zase pozitivní účinky neprokázaly. Ze studií však vyplynulo, že by se NSAID měla podávat spíše dlouhodobě [19]. Mediátorem zánětu je i CAP 37 (kationický antimikrobiální protein), který způsobuje chemotaxi monocytů ke kapilárnímu endotelu. Na tyto mediátory zánětu reagují buňky kapilárního endotelu další tvorbou β A, a tak se poškození neuronů ještě zvětšuje [10].

Oxidativní stres a volné radikály (nositelé nepárového elektronu) jsou vedlejší produkty oxidačních a redukčních reakcí. Některé jsou velmi reaktivní, protože chybějící elektron získávají od dalších molekul, a tak je mohou poškodit. Kromě toho mohou způsobit i řetězovou

reakci, např. peroxidaci lipidů [10]. Peroxidace lipidů je neenzymatický proces a probíhá nekontrolovaně. Peroxidový zbytek lipidu odštěpuje vodík od sousedních nenasycených mastných kyselin, které iniciují řetězovou reakci. Ukončení nastane, spojí-li se radikál s radikálem, či radikál s antioxidantem (α -tokoferol, vitamin E). Studie prokázaly zvýšené biomarkery peroxidace lipidů i v tkáni mozku s mírným kognitivním poškozením. Navíc jsou tyto biomarkery dobře detekovatelné v tělních tekutinách. Jejich stanovení by mohlo zvyšovat přesnost časné diagnostiky během prodromální fáze a také by měly být zváženy jako klíčové pro cílenou terapii [20].

Za další příspěvek negativního působení oxidativního stresu lze považovat i vyšší přítomnost železa, hliníku a rtuti v mozku, které se během tvorby radikálů účastní jako katalyzátory. Poškození v neuronálních klubkách způsobené pokročilou glykosylací také vede k uvolňování volných radikálů [10].

3.1.3.7 Amyloidní angiopatie

Cerebrální amyloidní angiopatie je popisný termín pro onemocnění cév způsobené ukládáním β A [21]. Způsobuje poškození korových kapilár i větších cév a projevuje se v 90 % případů AD. Asi třetina nemocných je postižena i vícečetným mozkovým infarktem, ischemickými změnami v bílé hmotě mozkové nebo drobnými ložisky krvácení, přičemž v polovině těchto případů se vyskytuje alela pro ApoE 4 [10]. Existuje obecný problém s odstraněním nerozpustného β A ze stěn tepen, léčba by tedy měla být zaměřená na eliminaci proteinu. Prozatím ale taková léčiva známa nejsou, a proto se používá kyselina acetylsalicylová (ASA), která zlepšuje perfuzi mozku a je nejlepší volbou u profylaxe. Při této indikaci se podává 100 mg ASA denně [21].

3.1.4 Příznaky

Během AD se objevují příznaky různého typu: porucha kognitivních funkcí, změny v chování a změny každodenního života. Zpočátku se objevují změny nálady a poruchy kognitivních funkcí (hlavně porucha paměti). Posléze neuropsychiatrické změny, zhoršení hybnosti, postupně pacienti ztrácí i základní dovednosti (hygienické návyky, schopnost přijímání potravy) a jsou inkontinentní, plně odkázáni na pomoc okolí. Délka a průběh nemoci se liší, většinou nemoc trvá několik let, je však nevyléčitelná a končí úmrtím pacienta [22].

Muži umírají dříve než ženy. Rozdíl mezi ranou a pozdní formou je zejména v tom, že u rané formy je znatelnější poškození jazyka, apraxie a deprese s vyšším skóre [10].

3.1.5 Diagnóza

Definitivní diagnózou je pouze histologické vyšetření tkáně (biopsie nebo diagnóza *post mortem*) [22], pravděpodobná diagnóza se určuje pomocí typických klinických příznaků – mezinárodně doporučených a uznávaných kritérií diagnózy: diagnóza demence, porucha dvou nebo více poznávacích funkcí, progresivní zhoršování paměti, pacient nemá poruchu vědomí, onemocnění začíná mezi 40. a 90. rokem – nejčastěji po 65. roce, u pacienta se vyloučilo jiné onemocnění mozku apod. [10].

3.1.6 Rizikové faktory

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem (RF) je věk, dalším v pořadí je přítomnost ApoE 4, protože u lidí bez přítomnosti alel pro ApoE 4 je pravděpodobnost vzniku nemoci asi 9 %, u heterozygotů 29 % a u homozygotů 83 %. Dalšími RF jsou výskyt AD a výskyt Downova syndromu (DS) v rodině. DS je trisomie 21. chromozomu, na tomto chromozomu se nachází i gen pro tvorbu ApoE, což způsobuje větší produkci β A, a tvoří se tak více plaků. Díky tomu se demence rozvíjí u 40–75 % osob s DS. Mezi další významné RF patří ženské pohlaví a nízká úroveň dosaženého vzdělání v mládí. Dalšími RF jsou metabolický syndrom, kouření, abúzus alkoholu nebo časté úrazy hlavy. Poslední studie jako RF uvádí např. souvislost s perinatálními faktory a faktory ovlivňujícími růst a vývoj mozku v raném dětství (jedinci s větší lebkou a delšími nohama mají v pozdějším věku nižší prevalenci, naopak smrt rodičů v dětství prevalenci zvyšuje) [9].

3.1.7 Farmakoterapie

Rozlišujeme léčbu kognitivních a ostatních poruch. Léčba kognitivních poruch má pozitivní vliv i na ostatní projevy nemoci, pouze však zpomaluje progresi nemoci [22].

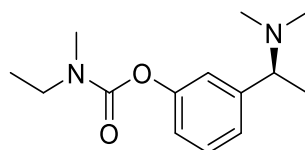
3.1.7.1 Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI)

AChEI jsou oproti přímé terapii agonisty receptorů mnohem lépe snášeny, staly se tak jednou z hlavních skupin terapeutik této choroby. Zmírňují symptomy AD, zlepšují denní

aktivity i neuropsychiatrické symptomy, což vede k prokázanému oddálení progresu AD. Používají se u mírných a středních forem AD. Zástupci AChEI mají různé struktury. Donepezil a galantamin jsou relativně selektivní vůči AChE. Takrin a rivastigmin inhibují AChE i BuChE. Nevýhodou těchto léčiv je hlavně výskyt gastrointestinálních nežádoucích účinků (nauzea, zvracení, průjem, nechůť k jídlu), které se však dají omezit titrováním dávky nebo premedikací pomocí centrálně působících antiemetik [13].

3.1.7.1.1 Rivastigmin

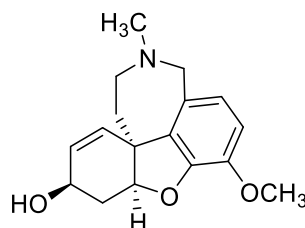
Rivastigmin je kompetitivní a reverzibilní ChEI. Obsahuje terciární aminoskupinu, což umožňuje jeho průnik přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a usnadňuje se tak jeho dostupnost v CNS [23]. Rivastigmin se kovalentně váže na cílový enzym (AChE nebo BuChE), se kterým tvoří komplex, čímž tento enzym dočasně inaktivuje [24]. Má výrazné gastrointestinální (GIT) vedlejší účinky, ty lze minimalizovat častějším dávkováním nebo použitím jiné lékové formy, transdermální náplasti. Vyšší snášenlivost a snadné použití této lékové formy vedou k vyšší adherenci pacienta [25].



Obrázek 1 Rivastigmin

3.1.7.1.2 Galantamin

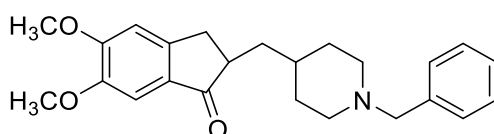
Galantamin byl jako alkaloid izolován již v padesátých letech 20. století [23]. Jde o selektivní, kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE. Kromě toho inhibuje i nikotinové receptory (nejspíše vazbou na alosterické vazebné místo receptoru) a zesiluje tak vlastní účinek acetylcholinu na nikotinové receptory. Lze tak dosáhnout zvýšené aktivity cholinergního systému, což vede ke zlepšení kognitivních funkcí. Velmi dobře se vstřebává. Jelikož působí i na periferní nervový systém, způsobuje nežádoucí účinky v GIT soustavě [26].



Obrázek 2 Galantamin

3.1.7.1.3 Donepezil

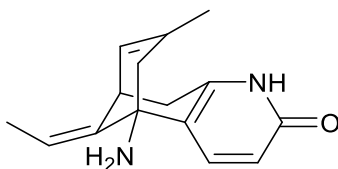
Donepezil je specifický a reverzibilní inhibitor AChE. Donepezil inhibuje AChE 1000krát více než BuChE, která se vyskytuje převážně na periférii. Má dobrou biologickou dostupnost a dlouhý poločas účinku. Navíc má oproti ostatním zástupcům minimální nežádoucí účinky [27]. Vykazuje též neuroprotektivní účinky např. tím, že zpomaluje progresi atrofie hipokampu [28]. Donepezil má i protizánětlivé účinky proti lipopolysacharidům a patologii τ -proteinu a přímo inhibuje aktivaci mikroglíí, které jsou β A indukované [29].



Obrázek 3 Donepezil

3.1.7.1.4 Huperzin A

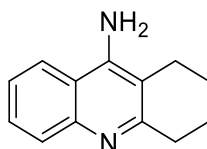
Huperzin A je lykodynový alkaloid, který byl izolován z *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. Je současně inhibitorem AChE a antagonistou *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů. Jako léčivo je registrován v Číně, u nás je uváděn jako složka některých doplňků stravy. V současnosti není jako léčivo AD schválen v USA ani v Evropě [30].



Obrázek 4 Huperzin A

3.1.7.1.5 Takrin

Takrin byl původně vyvíjen jako antibakteriální sloučenina, uplatnil se ale jako antidotum kurare. Později byl schválen i pro léčbu AD, ale díky poměrně významné hepatotoxicitě a GIT nežádoucím účinkům byl brzy stažen [23].



Obrázek 5 Takrin

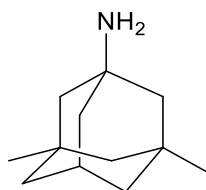
3.1.7.2 Inhibitory NMDA receptorů

Druhou významnou skupinou léčiv jsou inhibitory NMDA receptorů, které mají neuroprotektivní účinek. Hlavním zástupcem této skupiny je memantin, který brání aktivaci NMDA receptorů, na které se váže glutamová kyselina, jejíž hladina je v CNS při výskytu AD zvýšená [9]. Zvýšené množství glutamové kyseliny vede k excitotoxickému poškození neuronů [30]. Nadměrné uvolňování excitačních AK a jejich vazba na receptory zvyšuje influx vápenatých kationtů do neuronu, což spustí signalizační kaskádu, která vede až k apoptóze buňky [9]. Inhibicí těchto receptorů se tak snižuje glutamátem navozená neurotoxicita [30].

3.1.7.2.1 Memantin

Memantin jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů chrání neurony před neurotoxickým (excitotoxickým) působením glutamátu tím, že nahrazuje v iontovém kanálu Mg^{2+} ionty a blokuje tak vstup Ca^{2+} iontů do buněk. Po impulzu z presynapse ale rychle opouští iontový kanál a umožní tak glutamátu fyziologickou funkci v procesu učení a paměti. Z toho vyplývá, že memantin blokuje patologickou aktivitu NMDA receptorů, ale fyziologická zůstává zachována. Také blokuje serotoninové 5-HT₃ receptory, čímž dochází k usnadnění procesu učení a paměti [31].

Podávání memantinu zlepšuje kognitivní funkce. Způsobuje nežádoucí účinky jako závratě, bolest hlavy, únavnost a halucinace, závažné nežádoucí účinky pozorovány nebyly. V kombinaci s donepezilem výrazně zmírňuje poruchy chování, jeho kombinace s AChEI je tedy vhodná [30]. Navíc bylo zjištěno, že jako antagonist 5-HT₃ receptorů také potlačuje nauzeu a narušenou GIT motilitu. Proto po přidání memantinu k donepezilu dochází ke snížení výskytu GIT nežádoucích účinků [31].



Obrázek 6 Memantin

3.1.7.3 Nové přístupy v terapii

Většina nových léčiv je zaměřena na ovlivnění amyloidní kaskády, a sice na chybné štěpení APP způsobené patologickými β - a γ -sekretasami, které vede ke vzniku neurotoxického β A [30].

V centru pozornosti jsou skupiny látek, které zabraňují vzniku neuritických plaků pomocí aktivní nebo pasivní imunizace. Pasivní imunoterapie se snaží udržovat umělé hladiny protilátek IgG (imunoglobulin G) proti β A, a tím zabránit jeho ukládání. Vyšší efektivita těchto látek se předpokládá u časných stádií AD. Klinicky testované jsou např. gantenerumab a solanezumab. Jsou zde však obavy z důvodu nežádoucích účinků této terapie. Dalším přístupem k pasivní imunizaci je podávání intravenózních imunoglobulinů (IVIG), což je směs přirozených lidských imunoglobulinů a protilátek proti β A. Tyto látky se v pilotních studiích zatím jeví velmi slibně [30].

Dalším léčebným cílem jsou inhibitory β -sekretasy a γ -sekretasy. Žádná léčiva z této skupiny se zatím klinicky neuplatnila [30]. U inhibitorů β -sekretasy byly zatím zkoušeny tři generace léčiv. První se neuplatnila kvůli nízké biologické dostupnosti a nízkému průniku přes HEB. Druhá generace selhala kvůli závažným nežádoucím účinkům, jaterní hepatotoxicitě. Třetí generace měla slibné účinky na zvířecích modelech, avšak v únoru 2017 byl klinický výzkum zastaven z důvodu nedostatečné účinnosti u pacientů s AD [32].

Byly testovány i modulátory γ -sekretasy. Léčivo semagacestat selhalo ve třetí fázi klinického hodnocení kvůli zhoršení příznaků některých pacientů. Ve druhé fázi klinických studií bylo zastaveno zkoušení avagacestatu, protože způsoboval závažné nežádoucí účinky, a to konkrétně mikrokrvácení do mozku a nemelanomovou rakovinu kůže pacientů. Perorálně dostupný selektivní γ -sekretasový modulátor EVP-0962, který způsoboval tvorbu kratších a méně toxických peptidů a měl pozitivní účinky na AD, byl ve druhé fázi klinických studií též pozastaven. Nyní je ve druhé fázi klinických studií modulátor γ -sekretasy pinitol, cyklický cukerný alkohol [32].

Zajímavou terapií je plazmaferéza, metoda, při které dochází k výměně plazmy, snižuje se tím tak koncentrace β A v krvi a nepřímo i v likvoru, protože se koncentrace mezi nimi neustále ustaluje. Při této terapii byly zjištěny pozitivní výsledky ve zlepšení kognitivních funkcí. Rozšíření této metody brání zatím její celková náročnost [33].

Některé studie zkoumají již dostupná léčiva a jejich účinnost v závislosti na fenotypu i genotypu ApoE, aby se tak dalo dosáhnout většího efektu. Další studie se zaměřují na ovlivnění zánětlivých či neurodegenerativních změn. Testují se antagonisté fosfodiesteras, agonisté nikotinových receptorů, antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykosylace, látky ovlivňující mitochondriální funkce a modulující zánětlivé reakce nebo vakcíny proti změněnému τ -proteinu a další [30].

Významný pokrok v léčbě AD by také mohl znamenat objev, že molekula brichos, která se běžně v těle vyskytuje, dokáže v mozku zpomalovat tvorbu amyloidních plaků tím, že blokuje agregaci toxického β A 42 [34].

Jiný výzkum zjistil, že verapamil, běžně používaný blokátor vápníkových kanálů, inhibuje fosforylaci τ -proteinu, měl by být tedy zvážen pro terapii AD [35].

Jsou zkoumány i nové lékové formy již používaných léčiv, které by mohly zvýšit prostupnost léčiv přes HEB. Novou perspektivní lékovou formou by se např. mohla stát intranasální mikroemulze, která byla zatím *ex vivo* zkoušena u rivastigminu [36].

3.1.7.3.1 Alzheimerova choroba a diabetes

Podle některých studií je zvýšené riziko rozvoje AD u diabetických pacientů. Metformin je nejčastěji používané perorální antidiabetikum. Kromě toho, že snižuje glykémii, toto léčivo upravuje hodnoty krevních lipidů, má pozitivní vliv na proces hemostázy a má protizánětlivé účinky. Několik klinických studií uvádí, že dlouhodobé užívání metforminu přispívá ke zlepšení kognitivních funkcí, u jiných antidiabetik tento účinek pozorován nebyl. Přesný mechanismus účinku metforminu v patologii AD zatím znám není. Vědci tvrdí, že aktivace AMPK-dependentní dráhy (adenosin monofosfát-aktivovaná protein kinasa (AMPK), enzym zajišťující homeostázu buněčné energie) v lidských nervových kmenových buňkách, může být odpovědná za neuroprotektivní účinek metforminu. Dále bylo zjištěno, že metformin výrazně snižuje expresi β -sekretasy a tím snižuje produkci β A. Existují také důkazy, že metformin snižuje aktivitu AChE a má v mozku protizánětlivé a antioxidační účinky. Díky těmto vlastnostem a bezpečnému farmakokinetickému profilu by měl být metformin zvážen jako léčivo v prevenci nejen AD, ale i dalších neurodegenerativních nemocí [37].

Podle výsledků posledních studií by se v terapii AD měly provést určité změny. AD by měla být považována za onemocnění více hlavních patologických procesů (vaskulární hypoperfuze mozku s přidruženou mitochondriální dysfunkcí, destruktivní ukládání bílkovin,

nekontrolovaný oxidační stres a prozánětlivé imunitní procesy mikroglíí a astrocytů), nikoliv pouze jednoho. Nová terapie by tedy měla cílit proti více patologickým procesům současně [38].

3.1.7.3.2 Propyl oligopeptidasa

Propyl oligopeptidasa (POP) je cytosolická serinová endopeptidasa, která hydrolyzuje peptidy obsahující prolin (AK). Fyziologicky štěpí např. malé peptidové hormony a neuropeptidy v mozku, které jsou zapojeny do procesů jako je učení nebo paměť [39]. POP urychluje agregaci α -synukleinu a POP inhibitory mohou tuto agregaci blokovat [40].

Normálně je POP spojena s výskytem α -synukleinu v Lewyho tělíscích u Parkinsonovy choroby. POP se u AD vyskytuje v souvislosti s β A, τ -proteinem a astrocyty. Může být tedy spojena i s patogenezí AD [40]. Důkazy o fyziologické funkci tohoto enzymu však stále chybí, i přes to, že inhibitory peptidas jsou využívány k vývoji léčiv, z nichž některé jsou nyní v klinických studiích jako látky zlepšující paměť u starších pacientů, nebo jako látky používané u neurologických poruch [39].

3.1.7.4 Doplnková terapie

Léčba AD by neměla spočívat pouze ve farmakoterapii, důležitá je její komplexnost. Za vhodnou doplňkovou terapií se považuje přiměřená fyzická aktivita, kognitivní trénink (čtení a interpretace textů, hra se slovy, křížovky) nebo muzikoterapie [30].

Významné místo ve farmakoterapii zaujímá i symptomatická léčba jiných než kognitivních poruch, spojených se syndromem demence. Při depresi a úzkosti se podávají antidepressiva typu SSRI či SNRI, při psychotických projevech atypická antipsychotika. Těchto psychofarmak se využívá až po selhání nefarmakologických postupů [30].

Dále se používají nootropika, látky zvyšující mozkový metabolismus tím, že ho chrání před nepříznivými vlivy: hypoxie, oxidativní metabolismus glukózy, neuronální proteosyntéza nebo oxidativní stres. Obecně jsou tyto látky velmi dobře tolerované a způsobují minimum nežádoucích účinků. Nejpoužívanějším nootropikem je piracetam, často se používají i pyrinitol, extrakt z *Ginkgo biloba* L.; další látky používané v doplňkové léčbě jsou lecitin nebo antioxidanty (vitamin C, E, koenzym Q₁₀) [10].

3.2 *Liriodendron tulipifera* L. – liliovník tulipánokvětý



Obrázek 7 *Liriodendron tulipifera* L. [41]

3.2.1 Taxonomické zařazení [42]

Třída: Magnoliopsida

Řád: Magnoliales

Čeleď: Magnoliaceae

Rod: *Liriodendron*

Druh: *Liriodendron tulipifera* L. – liliovník tulipánokvětý

3.2.2 Botanická charakteristika

Liliovník je mohutný strom, vysoký 30 až 40 m, v České republice je pěstován jako okrasný strom převážně v parcích. Do Evropy byl introdukován v roce 1661, původně pochází ze Severní Ameriky [45], kde je v tamních smíšených lesích hojně rozšířen. Může

dorůst výšky až 50 metrů a dožívá se nezhodně stáří až 400 let. Liliovníky jsou vývojově velmi staré dřeviny, které se již v druhohorách daly nalézt nejen v Severní Americe, ale i v Číně (zde hlavně *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.) nebo v Evropě. Poskytují velmi kvalitní jádrové dřevo, které s přibývajícím stářím stromu tmavne a hojně se využívá v nábytkářství. U mladých stromů je dřevo bílé, postupně žloutne a u velmi starých stromů se zbarvuje do modra. Jako rychle rostoucí dřevina se využívá i v lesnictví. Mezi ostatními stromy vyniká velkými, intenzivně vonícími zvoncovitými květy a zvláštními lyrovitými listy, které se na podzim barví do žluta [43].

3.2.3 Morfologický popis

Koruna stromu je rozložitá nebo kuželovitá, větve vzpřímené, řapíkaté listy mají charakteristický lyrovitý tvar [44], jsou 10–15 cm dlouhé, jsou střídavé, na obou stranách lysé, se 4–6 laloky, řapíky dlouhé asi 10 cm. Jednotlivé květy jsou žlutozelené s oranžovými proužky, tři kališní lístky jsou rovnovážně odstálé, šest korunních lístků je vzpřímených [45], tvarem podobné tulipánu a jsou 5–7 cm dlouhé [44]. Plodem jsou dvousemenné nažky (křídlaté, asi 3 cm dlouhé, křídlo zašpičatělé a tuhé) [45], které tvoří plodenství připomínající šištici, po dozrání se na stromě rozpadají. Kůra je v mládí šedohnědá, později rozpuká, je hluboce brázditá a barví se do červena. Liliovník má dlouhý a silný křovitý kořenový systém [44].

3.2.4 Nároky na prostředí

Liliovník je světlomilný, vyžaduje nejlépe výsluní, zastínění nesnáší. Neroste na příliš suchých nebo mokřích půdách. Vyhovují mu hluboké, těžší půdy, bohaté na živiny, ale vyhýbá se půdám s vysokým obsahem vápníku. Je mrazuvzdorný, snese exhalace i městské ovzduší [44]. Nejlépe se uplatňuje jako solitér, na našem území byl poprvé vysazen v Hluboké [45].

3.2.5 Využití liliovníku v etnomedicíně

Druhy, patřící do čeledi Magnoliaceae, byly a dodnes jsou v léčitelství v Asii a Severní Americe hojně využívány. Tyto druhy produkují lignany a seskviterpenové laktony, z nichž některé jsou značně bioaktivní. Informace o účincích vycházející z léčitelství většinou korelují s informacemi získanými z farmakologických studií [46].

Liliovník tulipánokvětý byl využíván Indiány v Severní Americe. Kůra tohoto stromu byla používána jako tonikum a stimulans proti anorexii, nevolnosti nebo úplavici, i když je méně aromatická než kůra magnolií ze stejné čeledi. Prášková kůra z kořenů se využívala jako antipyretikum. Cherokeeové liliovník používali jako anthelmintikum, antirevmatikum a proti průjmům a dalším nemocem. Tento strom byl také využíván pro léčbu dyspepsie a úplavice. Je uveden v U.S. Pharmacopoeia (americkém lékopise). Příbuzný *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. je známý svými antipyretickými účinky [46].

3.2.6 Obsahové látky

U lignanů, steroidů a dalších látek izolovaných z liliovníku byl prokázán potenciální antioxidační účinek. Navíc některé z těchto látek měly schopnost inhibovat aktivitu tyrosinasy a snížit obsah melaninu v živočišných buňkách. Proto by mohly být používány v potravinářském průmyslu, kosmetickém průmyslu k bělení kůže nebo k terapeutické aplikaci [47].

Lignany, polyfenoly nacházející se v rostlinách, byly z liliovníku izolovány a zkoumány již v 50. letech. Byl izolován liriodendrin, bezbarvá krystalická látka bez chuti a zápachu. Zředěnými kyselinami se hydrolyzuje na D-glukosu a liriioresinol [48].

Účinky liriodendrinu byly zkoumány na gastritidu a peptický vřed. Bylo objeveno, že liriodendrin zvyšuje hladinu ochranného faktoru prostaglandinu E₂, snižuje objem žaludeční šťávy v žaludku a mírně zvyšuje pH žaludku. Také inhibuje kolonizaci žaludeční sliznice bakterií *Helicobacter pylori* a je účinný proti gastritidě i peptickému vředu. Z těchto výsledků vyplývá, že by měl být liriodendrin zvažován pro léčbu a protekci před gastritidou a peptickým vředem [49].

3.2.7 Obsah alkaloidů

Přítomnost alkaloidů v liliovníku byla poprvé zjištěna v listech v roce 1935. Později v roce 1960 byly ze dřeva tohoto druhu izolovány první alkaloidy: glaucin, liriodenin a O-methylaterolin (zástupci skupiny 7-oxoaporfinu). V 70. letech byly alkaloidy detekovány již ve všech rostlinných orgánech [50].

Zatím byly izolovány isochinolinové alkaloidy **oxoaporfínového** typu: liriidenin, aterospermidin, oxoxylopin = lanuginosin [51], liriidendronin, glauvin = korunnin [52] lirinidin, lysikamin, *O*-methylaterolin = oxoglaucin [50],

aporfínového typu: anonain, norglaucin, kaaverin, isolaurelin, norstefalagin [51], remerin, remerin-*N*-oxid, lirinidin, *N*-methyllaurotetanin, nornuciferin, *O*-methyllirinidin, lirinidin-*N*-oxid, glaucin, predicentrin, asimilobin [50], taliporfin [52], apoglaziovin = *N*-methylapokrotsparin [53], liriotulipiferin a lirioferin [52],

dehydroaporfínového typu: dehydroremerin, dehydroisolaurelin [50], dehydroglaucin [54],

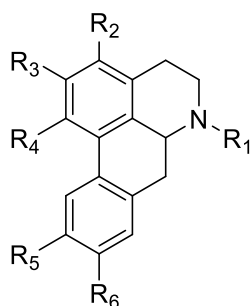
proaporfínového typu: *N*-methylkrotsparin = glaziovin [50],

tetrahydroprotoberinového typu: isokorypalmin [50], stefolidin [53].

Ostatní alkaloidy: kadaverin [53].

Strukturní typy alkaloidů izolovaných z liliovníku tulipánokvětého.

Aporfínový typ



apoglaziovin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{OH}$; $R_6 = \text{H}$

asimilobin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{H}$

glaucin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{OCH}_3$; $R_6 = \text{OCH}_3$

kaaverin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{H}$

lirinidin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{H}$

lirinidin-*N*-oxid: $R_1 = \text{O}, \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{H}$

lirioferin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{OH}$; $R_6 = \text{OCH}_3$

liriotulipiferin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{OH}$; $R_6 = \text{OCH}_3$

***N*-methyllaurotetanin:** $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{OCH}_3$; $R_6 = \text{OH}$

***O*-methyllirinidin:** $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{H}$

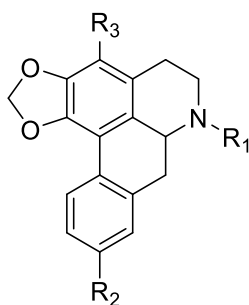
norglaucin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{OCH}_3$; $R_6 = \text{OCH}_3$

nornuciferin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{H}$

predicentrin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{OCH}_3$; $R_6 = \text{OCH}_3$

taliporfin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{OCH}_3$; $R_6 = \text{OCH}_3$

Obrázek 8 Aporfínové alkaloidy



anoain: $R_1 = H$; $R_2 = H$; $R_3 = H$

isolaurelin: $R_1 = CH_3$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = H$

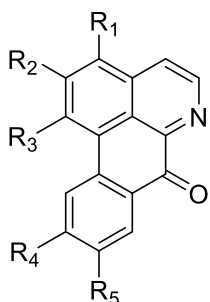
norstefalagin: $R_1 = H$; $R_2 = H$; $R_3 = OCH_3$

remerin: $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = H$

remerin-N-oxid: $R_1 = O, CH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = H$

Obrázek 9 Aporfinové alkaloidy substituované methylenedioxy- skupinou

Oxoaporfinový typ



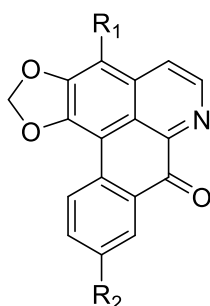
liridin: $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OCH_3$; $R_4 = H$; $R_5 = H$

liriodendronin: $R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = OH$; $R_4 = H$; $R_5 = H$

lysikamin: $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OCH_3$; $R_4 = H$; $R_5 = H$

O-methylaterolin: $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OCH_3$; $R_4 = OCH_3$; $R_5 = OCH_3$

Obrázek 10 Oxoaporfinové alkaloidy

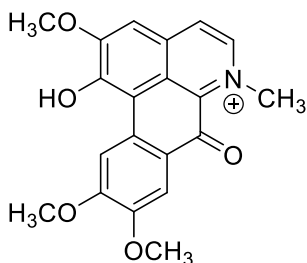


aterospermidin: $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$

lanuginosin: $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$

liriodenin: $R_1 = H$; $R_2 = H$

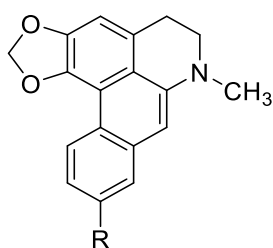
Obrázek 11 Oxoaporfinové alkaloidy substituované methylenedioxy- skupinou



glauvin = korunnin

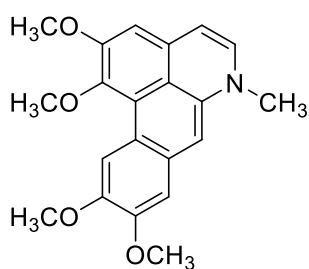
Obrázek 12 Kvarterní oxoaporfinové alkaloidy

Dehydroaporfínový typ



dehydroisolaurelin: R= OCH₃
dehydroremerin: R= H

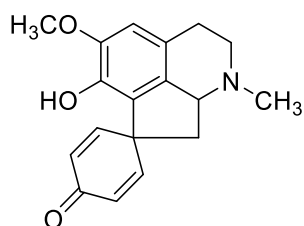
Obrázek 13 Dehydroaporfínové alkaloidy



dehydroglauicin

Obrázek 14 Dehydroglauicin

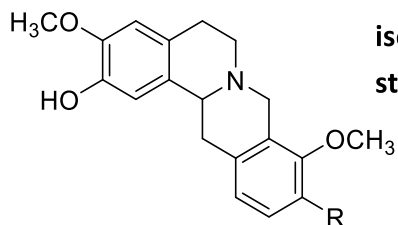
Proaporfínový typ



glaziovín

Obrázek 15 Glaziovín

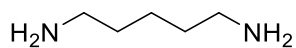
Tetrahydroprotoberínový typ



isokorypalmin: R= OCH₃
stefolidin: R= OH

Obrázek 16 Tetrahydroprotoberínový typ

Ostatní alkaloidy



kadaverin

Obrázek 17 Kadaverin

Bylo zjištěno, že liriotulipiferin a liriioferin jsou alkaloidy, které jsou ve dřevě produkovány pouze při poškození stromu [55].

Maximální množství alkaloidů v listech bylo pozorováno na jaře a v období časně vegetace rostliny, minimální množství na podzim [56].

3.2.8 Biologická aktivita alkaloidů

3.2.8.1 Inhibice lidských cholinesteras

Inhibiční účinky alkaloidů, které byly doposud z liliovníku izolované, na lidské ChE jsou shrnuty v tabulce. U většiny alkaloidů doposud tato aktivita zkoumána nebyla, u některých schopnost inhibice není vysoká, u jiných alkaloidů jsou však hodnoty zajímavé. Vyšší inhibiční aktivitu vykazuje např. liriodenin, isolaurelin nebo asimilobin. Hodnoty inhibičních aktivit se však v různých studiích významně liší (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 Inhibiční aktivita alkaloidů izolovaných z liliovníku vůči AChE a BuChE

Alkaloid	IC ₅₀ [μM]		Literatura	Zdroj cholinesteras
	AChE	BuChE		
asimilobin	321 ± 1,1	-	[57]	nespecifikováno
	123,4 ± 2,0	-	[58]	nespecifikováno
	8,7 ± 1,5	-	[59]	nespecifikováno
aterospermidin	-	19,34	[4]	koňské sérum
glaucin	89,0 ± 0,8	-	[60]	elektrický úhoř
isokorypalmin	196,0 ± 4,2	> 1000	[61]	lidská krev a plazma
isolaurelin	8,36 ± 1,19	-	[62]	elektrický úhoř
lanuginosin = oxoxylopin	42,5 ± 2,5	-	[63]	krysí mozková kůra
liriodenin	3,5 ± 1,0	-	[59]	nespecifikováno
	> 150,0	-	[58]	nespecifikováno
lysikamin	16,1 ± 1,5	-	[58]	nespecifikováno
N-methylaurotetanin	898,0 ± 10,5	> 1000	[61]	lidská krev a plazma
	-	218,81	[4]	koňské sérum
oxoglaucin	24,5 ± 0,6	-	[60]	elektrický úhoř
remerin	20,7 ± 1,3	-	[63]	krysí mozková kůra
stefolidin	> 100	-	[64]	elektrický úhoř

3.2.8.2 Účinky liriodeninu

Liriodenin, nejvýznamnější alkaloid liliovníku, se vyznačuje velkým množstvím nejrůznějších biologických aktivit. Již zmíněná inhibiční aktivita liriodeninu na lidské ChE se podle některých studií dá přirovnat k huperzinu A [59], je tedy velmi významná. Jiné studie však toto tvrzení nepotvrdily [58]. Liriodenin může cholinergní systém ovlivňovat i jiným způsobem, a to tak, že působí jako selektivní antagonist muskarinových acetylcholinových M₃ receptorů [65].

Cytotoxický liriodenin je silný inhibitor savčích topoizomeras II (navíc bylo zjištěno, že není substrátem pro efluxní transportéry, které jsou citlivé na verapamil, což usnadňuje jeho vstup do organismu). Inhibice mikrobiálních topoizomeras zkoumána nebyla, avšak inhibitory savčí topoizomerasy II mají často aktivitu i proti fungální a bakteriální topoizomerase II, z čehož vyplývá, že by liriodenin mohl být aktivní i vůči nim [66]. Silný cytotoxický (antiproliferativní) účinek je přičítán 7-oxo skupině a methylenedioxy funkčním

skupinám, mezi jejichž nositele liriodenin patří [67]. Tento alkaloid inhibuje proliferaci buněk melanomu, dále má protimigrační potenciál, aniž by vyvolával významnou cytotoxicitu. Liriodenin má tedy protinádorové účinky a jeví se jako slibná chemopreventivní látka melanomu lidské pokožky [68].

Tento alkaloid disponuje též antimikrobiálními účinky např. vůči grampozitivním bakteriím a antimykotickými účinky proti několika druhům plísní, zejména vůči *Trichophyton mentagrophytes* a *Syncephalestrum racerosum*. Tyto účinky jsou srovnatelné s griseofulvinem a kandidinem. Také působí proti řadě plísní rostlin, které napadají např. ječmen, fazole nebo rýži. Navíc jeví relativně nízkou toxicitu v testech na akutní toxicitu [69]. Byly prokázány i antiprotozoální účinky, nejsilnější aktivitu vykazoval alkaloid proti *Leishmania major* a *Leishmania donovani* [70].

Liriodenin může ovlivňovat i kardiovaskulární systém. Jeho elektrofyziologické působení, zvláště blokace Na⁺ a K⁺ kanálů, má za následek antiarytmické účinky. Během testování uměle vyvolaného infarktu u kryš liriodenin zvýšil koronární průtok díky zvýšenému uvolňování NO a snížil rozsah infarktu myokardu. Je tedy zřejmé, že liriodenin snižuje rozsah kardiovaskulárního poranění během ischemicky-reperfuzních podmínek [71].

Liriodenin působí proti monoaminoxidase A (MAO-A) [72], což může být příčina toho, že vykazoval podobné účinky jako antidepresiva a zlepšoval účinnost jiných antidepresiv (imipraminu a klomipraminu) [73].

Liriodenin také reguluje syntézu dopaminu pomocí částečného snížení aktivity tyrosinhydroxylasy (jeden z enzymů v kaskádě syntézy dopaminu). Výzkum naznačuje, že by tato regulace syntézy mohla být do budoucna významnou alternativou léčby Parkinsonovy choroby. Přiměřená lipofilita/rozpustnost a průměrná doba účinku tohoto alkaloidu umožňují vysoký a selektivní terapeutický účinek [74].

Byly objeveny též mírné hepatoprotektivní účinky liriodeninu vůči indukovanému poškození jaterních buněk [75].

Je známa i antioxidační aktivita liriodeninu, která byla zjišťována pomocí hledání antiradikálových účinků, chelatace kovů a redukčních účinků na Fe³⁺ [76].

Liriodenin má zřejmě účinky i proti dlouhodobým komplikacím diabetu, které souvisejí se zvýšenou aktivitou aldosaředuktasy. Při dlouhodobě zvýšené glykémii se totiž kumulují polyoly (sorbitol, vzniká pomocí aldosaředuktasy), které mohou působit osmoticky

např. v oční čočce. Inhibiční účinky vůči aldosaředuktase jsou připisované isochinolinové struktuře, která je v liriódeninu obsažena [77].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie

- amoniak vodný roztok 25–29% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- diethylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)
- kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- kyselina trifluoroctová >99,5% (Fluka – Bukurešť, Rumunsko) (TFAA)
- uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)

4.1.2 Rozpouštědla

- aceton p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Me_2CO)
- acetonitril (Ing. Kroupa – Balex, Pardubice – Rosice) (CH_3CN)
- benzin lékařský RN vyhovující ČL 2009 a ČSN 65 6544 (Ing. Švec – Penta, Praha) (benzin)
- chloroform deuterovaný pro NMR analýzu chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl_3)
- cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- diethylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)
- diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- dichlormethan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2Cl_2)
- ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- ethylester kyseliny octové = ethyl acetát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- chloroform (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl_3)
- methanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- methanol deuterovaný pro NMR analýzu methanol-d4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)
- methanol HPLC gradient (J. T. Baker, Deventer, Netherlands) (MeOH)
- toluen č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- voda superčistá

4.1.3 Pufry

- 100mM fosfátový pufr pH 7,4 (byl připravený smícháním roztoků $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $31,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a Na_2HPO_4 $28,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ s vodou, objemově v poměru 9,5 : 40,5 : 50)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 (byl připravený smícháním roztoků $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $1,56 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a Na_2HPO_4 $1,42 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ s vodou, objemově v poměru 9,5 : 40,5 : 50)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM NaCl (8,766 g NaCl bylo rozpuštěno v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4, do objemu 1000 ml)
- PBS: 100mM Na/K fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl (Byl připravený smícháním 20 ml roztoku A se 100 ml roztoku B. Roztok A: 0,68 g KH_2PO_4 a 1,5 g NaCl bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Roztok B: 0,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,5 g NaCl bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.)

4.1.4 Absorbenty pro chromatografii

- Na sloupcovou chromatografii byl použit neutrální oxid hlinitý (Al_2O_3) o velikosti částic 63–200 μm ; Across (Lach-Ner, Neratovice)
- Analytické TLC desky Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC (Merck Millipore, Praha). Desky 20 × 20 cm byly používány pro kontrolní účely a stříhány na výšku 7,5 nebo 10 cm (šířka byla vždy zvolena dle potřeby). Pro preparativní TLC byly používány desky o rozměrech 20 × 10 cm.
- Na přípravu preparativních desek byl použit pro TLC: Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha).

4.1.5 Pomocný materiál

- křemelina (Sigma Aldrich, Praha)
- silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)
- síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2SO_4)
- vata

- vliselin

4.1.6 Přístroje

- knihovna spekter NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)
- microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- odstředivka Avanti J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- spektrometr EI/MS na GC-MS system using an Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 x 025 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- spektrometr ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Arcade, New York, USA)
- spektrometr VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- statistický program GraphPad Prism 5.0 2006 (Graph PaD Software, SanDiego, California, USA)
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)
- vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany)

4.1.7 Využívané soustavy pro TLC

S1: C₆H₅CH₃ + Et₂NH (95 : 5)

S2: C₆H₅CH₃ + Et₂NH (90 : 10)

S3: C₆H₁₂ + EtOAc + Et₂NH (50 : 40 : 10)

S4: C₆H₅CH₃ : EtOAc : Et₂NH (15 : 75 : 10)

S5: C₆H₅CH₃ : EtOAc : Et₂NH (50 : 40 : 10)

S6: CH₃CN + MeOH + TFAA (40 : 10 : 0,1)

S7: $C_6H_{12} + Me_2CO + NH_4OH$ (30 : 60 : 1)

S8: $C_6H_5CH_3 + EtOAc + Et_2NH$ (70 : 25 : 5)

S9: $C_6H_5CH_3 + Me_2CO + EtOH + NH_4OH$ (40 : 40 : 6 : 2)

S10: $C_6H_5CH_3 + C_6H_{12} + Et_2NH$ (45 : 50 : 5)

S11: $C_6H_5CH_3 + EtOAc + Et_2NH$ (25 : 70 : 5)

4.1.8 Detekční činidla

• **Dragendorffovo činidlo** bylo připraveno ze dvou roztoků (A, B), které byly smíchány v poměru 1:1 (roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody; roztok B: 32 g KI v 80 ml vody). Takto vznikl zásobní roztok, 5 ml tohoto roztoku bylo dále smícháno s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody, a tak vznikl vlastní detekční roztok. Oba roztoky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

• **Mayerovo činidlo** vzniklo rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a přidáním 1,35 g $HgCl_2$ v prášku. Bylo mícháno do rozpuštění vzniklé sraženiny. Činidlo bylo uchováváno v lednici při 4 °C.

4.1.9 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

• **Roztok 5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)** byl připraven rozpuštěním látky v 100mM fosfátovém pufru pH 7,4. Vzniklý roztok by měl být jen slabě žlutý. Byl uchováván v lednici při 4 °C, max. 1 týden.

• **Roztok ATChI (10mM)** byl připraven rozpuštěním látky ve vodě, vznikl čirý roztok. Byl uchováván v lednici při 4 °C, max. 1 týden.

• **Roztok BTChI (10mM)** byl připraven stejným způsobem a uchováván stejně jako roztok ATChI.

4.1.10 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP

• **Roztok 10mM Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu** byl připraven rozpuštěním látky v 40% 1,4-dioxanu. Byl uchováván v lednici při 4 °C.

4.2 Metody

4.2.1 Obecné postupy

4.2.1.1 Příprava rozpouštědel

Rozpouštědla byla před použitím přečištěna pomocí destilace a byla uchovávána v nádobách z tmavého skla (chráněna před světlem).

4.2.1.2 Odpařování

Sumární ethanolové extrakty pro izolaci alkaloidů byly odpařeny na poloprovozní odparce Laborota 20 Heidolph na vodní lázni při teplotě 50 °C a sníženém tlaku ca 1,33 kPa.

Frakce získané sloupcovou chromatografií elucí směsí byly odpařeny na vakuové odparce Laborota 4000 Heidolph na vodní lázni při 45 °C.

Eluáty získané při preparativní TLC byly odpařovány také při 45 °C.

4.2.1.3 Sušení a skladování

Alkaloidní extrakty, frakce v různých fázích zpracování i chemicky čisté látky byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru (vakuum cca 1,33 kPa) nad sušícími perlami silikagelu min. 24 h. Po vysušení byly skladovány v lednici při teplotě 2–8 °C.

4.2.1.4 Sloupcová chromatografie

Do chromatografického sloupce byla nalita suspenze adsorbentu (neutrální Al₂O₃ deaktivovaný 6 % vody) s rozpouštědly, která byla použita jako první eluční soustava (benzin + EtOAc). Na tuto suspenzi byl nanesen alkaloidní extrakt ve formě triturance s adsorbentem. Sloupcová chromatografie probíhala formou stupňovité eluce.

4.2.1.5 Příprava desek pro preparativní TLC

Na skleněné desky o rozměru 15 × 15 cm, které byly předem vyčištěny a odmaštěny, byla nalita předem připravená suspenze. Na jednu desku bylo použito 6,5 g silikagelu (Silica gel 60 GF₂₅₄), který se smíchal s 22,4 ml vody. Suspenze byla nanášena rovnoměrně a takovým

způsobem, aby byl povrch hladký a jednotný. Desky se následně nechaly sušit za pokojové teploty po dobu alespoň 24 hod.

4.2.1.6 Preparativní TLC

Směs alkaloidů byla nanášena na připravené skleněné nebo komerční hliníkové desky po rozpuštění v menším objemu CHCl_3 a EtOH (1:1 objemově), tak, aby byl start nejméně 1 cm od okrajů a takovým způsobem, aby množství dělené směsi nepřesahovalo $3 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-1}$ u skleněných laboratorně připravovaných preparativních desek a $1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-1}$ u komerčních desek. Podle toho byl vždy zvolen vyhovující počet desek. Po nanesení a odpaření rozpouštědel byly desky vyvíjeny v nasycených komorách (doba nasycení min. 20 min) buďto opakovaně stejnou mobilní fází nebo i jinou, znovu vždy ale až po odpaření rozpouštědel. Po oddělení látek byly chromatogramy detekovány pod UV ($\lambda = 254$ a 366 nm) a zóny byly označeny preparativní jehlou. Zóny o stejném R_f ze všech použitých desek byly vyškrábány a spojeny. Získané zóny byly smíchány se stejným objemovým množstvím křemeliny a v koloně vymývány směsí CHCl_3 a EtOH.

4.2.1.7 Detekce alkaloidů

Při přípravě alkaloidního extraktu byla přítomnost alkaloidů ve vodné fázi zjišťována pomocí Mayerova činidla. Po okyselení pomocí HCl na pH 2–3 a přidání 1–2 ml vody bylo k roztoku přidáno několik kapek činidla a v případě přítomnosti alkaloidů vznikla v roztoku bílá sraženina.

Kontrolní chromatogramy frakcí ze sloupcové chromatografie, preparativní TLC i kontrolní TLC u zjišťování čistoty izolovaných alkaloidů byly detekovány nejdříve pod UV lampou ($\lambda = 254$ a 366 nm), po označení viditelných zón pod UV byly chromatogramy detekovány postřikem Dragendorffovým činidlem. Po odvětrání činidla vzniklo v případě přítomnosti alkaloidů intenzivní oranžové zbarvení.

4.2.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností

4.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI)

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizací elektrosprejem v kladném modu. Jako analyzátor sloužila iontová past. MSⁿ spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV. Alkaloidy byly rozpuštěny v MeOH (1 mg·ml⁻¹) a zaváděny přímo pomocí sondy.

4.2.2.2 Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací (EI)

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Agilent 7890A GC 5975 v módu 70 eV s GC kolonou DP-5 MS. Alkaloidy byly rozpuštěny v MeOH (1 mg·ml⁻¹) a nástřik byl proveden v split módu v poměru 1:10. Detekce byla provedena pomocí srovnání spekter s NIST knihovnou a referenčními spektry alkaloidů, které byly již dříve v rámci skupiny ADINACO izolované a identifikované.

4.2.2.3 NMR analýza

Pro měření NMR spekter byl použit spektrometr VNMR S500, měření probíhalo za teploty 25 °C. Přístroj pracoval při frekvenci 499,87 MHz pro jádra ¹H a 125,70 MHz pro jádra ¹³C. Chemické posuny byly zaznamenávány jako hodnoty δ vyjádřené v pars per milion (ppm) a byly vztaženy na hodnoty vnitřního standardu (TMS). Spektra byla měřena v různých prostředích. V CDCl₃ byly hodnoty chemického posunu pro atomy ¹H δ = 7,26 ppm a pro ¹³C δ = 77,0 ppm. V CD₃OD byly pro ¹H δ = 3,30 ppm a pro ¹³C δ = 49,0 ppm. Naměřená data jsou ve výsledcích uváděna v pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ¹H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, dd = dublet dubletů, m = multiplet, bs = široký singlet) a interakční konstanta J (v Hz).

4.2.2.4 Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v roztocích alkaloidů v CHCl₃ na polarimetru P 3000. Specifická otáčivost byla potom dopočtena podle vzorce:

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

t = teplota měření; D = sodíková D čára (589,3 nm); α = naměřená otáčivost [°]; c = koncentrace měřeného alkaloidu [g·100 m⁻¹]; l = délka kyvety [dm].

4.2.3 Stanovení biologické aktivity

4.2.3.1 Příprava hemolyzátu a plazmy

Lidské cholinesterasy byly získané z krve zdravého dobrovolníka, ke které byla ihned po odběru přidána antikoagulační přísada (2 ml 3,4% citrátu sodného na 18 ml krve). Z krve byla oddělena plazma centrifugací při 4 °C a rychlosti 4000 ot·min⁻¹ na centrifuze Boeco U-32R, která následně sloužila jako zdroj BuChE. Oddělené erythrocyty byly použity jako zdroj AChE.

Erythrocyty byly třikrát promyty pomocí 5mM fosfátového pufru pH 7,4, který obsahoval 150mM NaCl a byly opět stejným způsobem centrifugovány. K promytým erythrocytům byl přidán 5mM fosfátový pufr pH 7,4, (tentokrát bez NaCl) v poměru 1 : 9 erythrocyty k pufru. Erythrocyty se nechaly spontánně hemolyzovat za stálého míchání po dobu 10 min.

Následně byla stanovena absorbance BuChE v plazmě a AChE v hemolyzátu. Dle potřeby byla hodnota absorbance upravena příslušným množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4. Enzymové preparáty byly uchovávány až do doby použití při -22 °C.

4.2.3.2 Stanovení absorbance enzymových preparátů a stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči lidským ChE

Stanovení inhibiční aktivity (IC₅₀) bylo provedeno pomocí modifikované Ellmanovy metody s využitím Ellmanova činidla (DTNB). Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BuChE) příslušnou cholinesterasou. Po enzymové hydrolýze je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin obsahující ve své molekule skupinu SH je detegován pomocí DTNB tím, že po reakci s thiocholinem dochází ke vzniku aniontu 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB⁻). Tento anion je pak detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm [78].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 8,3 μ l roztoku hemolyzátu/plazmy v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 o určité koncentraci (objemový poměr pro hemolyzát

1 : 0; 3 : 1; 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3; 1 : 4; 1 : 5 a pro plazmu 1 : 0; 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3; 1 : 4). Poté bylo přidáno 283 μ l 5 mM roztoku DTNB ve fosfátovém pufru pH 7,4 a 8,3 μ l zkoušeného alkaloidu o určité koncentraci v DMSO (40mM, 10mM, 4mM, 1mM, 0,4mM a 0mM). Směs byla třepána 1 minutu v mikrotřepačce a vložena do readeru SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader, kde byla inkubována při 37 °C po dobu 5 min. Po inkubaci bylo k vzorkům přidáno 33,3 μ l DMSO (slepý vzorek) nebo 33,3 μ l enzymového preparátu a po 2 minutách byla měřena absorbance. Pokud látka silně inhibuje cholinesterasy (0,4mM koncentrace alkaloidu vykazuje více než 3% inhibici), je nutné změřit další koncentrační řadu (0,1mM, 0,04mM, 0,01mM, 0,004mM, 0,001mM a čistý DMSO). Každá koncentrace alkaloidu byla připravena 6 \times a měřena při 37 °C. Absorbance u stanovení inhibiční aktivity AChE byla měřena při λ = 436 nm a BuChE při λ = 412 nm. 50% inhibiční aktivita byla dopočítána pomocí programu GraphPad Prism dle vzorce:

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

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

Zjištěná inhibiční aktivita IC₅₀ AChE a BuChE pro jednotlivé látky byla porovnána s IC₅₀ referenčních látek.

4.2.3.3 Stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči propyl oligopeptidase

Enzym POP, jehož specifická aktivita byla 0,2 U·ml⁻¹, byl rozpuštěn v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). K testování byla použita standardní polystyrenová 96 jamková mikrotitrační destička s rovným průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v DMSO (10 mM), z těchto roztoků byly naředěním superčistou vodou připraveny roztoky pro testování (10⁻³–10⁻⁷ M). Slepé vzorky měly přibližně stejnou koncentraci DMSO. Jako POP substrát byl použit Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 170 μ l PBS, 5 μ l roztoku testované látky o určité koncentraci a 5 μ l roztoku POP. Destička byla inkubována po dobu 5 min při teplotě 37 °C, do jamky bylo dále přidáno 20 μ l substrátu a směs byla znovu inkubována (30 min při 37 °C). Množství vytvořeného produktu *p*-nitroanilinu bylo přímo úměrné POP aktivitě. Měření probíhalo spektrofotometricky při λ = 405 nm na microplate

ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC₅₀. Zjištěná inhibiční aktivita IC₅₀ pro jednotlivé látky byla porovnána s IC₅₀ referenčních látek.

4.3 Izolace alkaloidů ze dřeva *Liriodendron tulipifera* L.

4.3.1 Příprava alkaloidního extraktu

Příprava alkaloidního extraktu nebyla součástí této diplomové práce, alkaloidní extrakt připravil prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Na přípravu alkaloidního extraktu bylo použito 44 kg rozemletých větvíček z *Liriodendron tulipifera* L. (Lindava 2010–2015, velikost do 5 mm). Toto množství bylo dvakrát extrahováno za varu 95% ethanolem vždy s pětinasobným množstvím rozpouštědla (objemově). Tyto extrakty byly spojeny, zfiltrvány a odpařeny za snížené teploty a tlaku do řídkého roztoku. Poté byla teplota zvýšena na 70 °C, byl přidán 1 l vody a oddestilován zbytek EtOH. Suspenze byla za tepla zředěna 7 l 2% HCl, 2 l vody (pH bylo cca 1–2). Po zchlazení byl extrakt zfiltrován přes vliselin.

Vzniklých 12 l hnědého kalného filtrátu bylo zfiltrováno přes vrstvu křemeliny, čirý hnědý filtrát byl zalkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9–10 a šedo zelený kalný roztok byl čtyřikrát vytřepán 3 l CHCl₃. CHCl₃ fáze byla odpařena a vzniklo tak 32,9 g velmi viskózního tmavě hnědočerveného odparku.

Bylo provedeno TLC sumárního chloroformového výtřepku v nasycené komoře směsí S1, vyvíjeno dvakrát, byl použit silikagel, detekce UV při 254 a 366 nm a Dragendorffovým činidlem.



Obrázek 18 Sumární alkaloidní chloroformový výtřepok *Liriodendron tulipifera* L.

4.3.1.1 Čištění chloroformového výtřepku (LT-d/CHCl₃-A)

101,6 g velmi viskózního hnědočerveného odparku bylo rozeřáno na 70 °C a bylo přidáno 250 ml 2% HCl, směs se důkladně protřepala a byla sonikována při 60 °C, stupeň sonikace 10 po dobu 10 min. Načervenalý roztok byl poté zfiltrován přes vliselin, zbytek v baňce se promyl horkou vodou a roztok byl doplněn na 1350 ml (pH cca 1). Po zchladnutí byl zalkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9–10 (vyloučila se intenzivně šedavá sraženina) a následně třikrát vytřepán 450 ml CHCl₃. Chloroformový roztok byl odpařen. Hmotnost tmavě hnědého velmi viskózního odparku byla 18,2 g.

4.3.1.2 Čištění předčištěného chloroformového výtřepku (LT-d/Et₂O-A)

18,2 g tmavě hnědého a velmi viskózního odparku bylo rozpuštěno ve 200 ml 2% HCl (sonikace 10 min při stupni 10), roztok byl slit, zbytek v baňce byl po přidání 25 ml horké vody zahřát na 70 °C. Poté bylo přidáno 25 ml 2% HCl, sonikováno 10 min při 60 °C. Po 30 min chladnutí byl roztok přidán k prvnímu podílu roztoku chloridů alkaloidů. Spojený roztok byl doplněn vodou na 900 ml a zfiltrován přes slabou vrstvu křemeliny. Vzniklý roztok (kyselý) byl třikrát vytřepán 250 ml Et₂O z důvodu odstranění nečistot. Vzniklo 2,53 g velmi viskózního žlutého olejovitého odparku, který byl z další práce vyloučen.

Kyselý předčištěný roztok byl alkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9–10, intenzivně se vyloučila práškovitá hmota ve formě bělavého sedimentu. Tato suspenze byla čtyřikrát vytřepána 300 ml Et₂O. Po odpaření rozpouštědla vzniklo 3,60 g velmi viskózního žlutého

pevného odparku. Po detekci Mayerovým činidlem bylo zřejmé, že roztok obsahuje ještě poměrně velké množství alkaloidů. Proto bylo provedeno další vytřepání, a sice třikrát pomocí 250 ml CHCl_3 . Odparek měl hmotnost 3,65 g a byl velmi viskózní, pevný a měl hnědozelenou barvu.

Na TLC byla použita komora nasycená vyvíjecí směsí S2, vyvíjení 1×, silikagel, detekce UV 254 a 366 nm, postřík Dragendorffovým činidlem.

D1 – Et_2O výtřepek z kyselého roztoku (pH 1)

D9 – Et_2O výtřepek z bazického roztoku (pH 9–10)

D9 (poslední v řadě) – CHCl_3 výtřepek z bazického roztoku (pH 9–10)



Obrázek 19 Přečištěné alkaloidní etherové a chloroformové výtřečky *Liriodendron tulipifera* L.

Oba alkaloidní výtřečky ze dřeva (Et_2O a CHCl_3) byly spojeny, jejich hmotnost byla 7,25 g.

4.3.2 Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu

Tento alkaloidní extrakt byl podroben sloupcové chromatografii za použití podtlaku (pomocí vodní vývěvy), přičemž bylo použito 225 g Al_2O_3 (deaktivovaný 6 % vody) jako adsorbentu, průměr kolony 4,3 cm, výška adsorbentu byla 16 cm.

Na přípravu trituratione alkaloidního extraktu bylo použito 28 g téhož adsorbentu. Extrakt byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 , do roztoku byl přimíchán adsorbent a suspenze byla na vodní lázni odpařena dosucha, trituratione byla následně dosušena v exsikátoru (alespoň 24 hod). Výška trituratione v sloupci byla 2,1 cm.

Eluce byla stupňovitá, a to směsí benzínu s EtOAc (80:20, 70:30, 50:50), dále pouze EtOAc, dále směsí EtOAc s MeOH (98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 50:50) a nakonec pouze MeOH. Jednotlivé frakce byly jímány po 250 ml. Na základě monitorování pomocí TLC (vyvíjecí směsi S3, S4, S5) s následným postřikem Dragendorffovým činidlem byly jednotlivé frakce spojeny do devíti souhrnných frakcí A–I (viz Tabulka 3).

Tabulka 3 Výsledné souhrnné frakce sloupcové chromatografie

Označení	spojené frakce	složení eluční směsi	hmotnost [mg]
A	1–3	benzin:EtOAc 80:20	80,2
B	4–7	benzin:EtOAc 80:20	448,6
C	8–14	benzin:EtOAc 80:20	294,8
D	15–18	benzin:EtOAc 80:20	304,8
	19–25	benzin:EtOAc 70:30	
	26–36	benzin:EtOAc 50:50	
E	37–46	EtOAc	312,2
F	47–58	EtOAc	378,1
G	59–76	EtOAc	578,6
	77–78	EtOAc:MeOH 98:2	
H	79–86	EtOAc:MeOH 98:2	931,8
	87–92	EtOAc:MeOH 95:5	
	93–94	EtOAc:MeOH 90:10	
I	95–98	EtOAc:MeOH 80:20	1,9454
	99–104	EtOAc:MeOH 50:50	
	105–110	MeOH	

Cílem této práce bylo dále zpracovat frakci H.

4.3.3 Izolace alkaloidů z frakce č. 79–94

931,8 mg odparku z frakce H bylo za pomoci sonikace a zvýšené teploty rozpuštěno v 10 ml 5% HCl (alkaloidy přešly do formy rozpustných chloridů) a zfiltrováno přes jehlu. Poté byla provedena extrakce pomocí Et₂O. Kyselý roztok byl následně neutralizován 25 ml 10% Na₂CO₃. Po neutralizaci byly alkaloidy 10× vytřepány 50 ml do diethyletheru H (Et₂O) = 411,2 mg, 5× 50 ml do ethyl acetátu H (EtOAc) = 180,0 mg a 3× 50 ml do chloroformu H (CHCl₃) = 190,0 mg. Tyto roztoky alkaloidů v nepolárních rozpouštědlech byly před odpařením sušeny bezvodým Na₂SO₄. Suspenze byla zfiltrována a filtrát byl odpařen.

4.3.3.1 H (Et₂O)

Byla zpracována podfrakce H (Et₂O), množství (m = 411,2 mg) bylo naneseno na 10 preparativních desek o velikosti 15 × 15 cm. Desky byly vyvíjeny nejdříve ve vyvíjecí soustavě S6 a poté v S7. Byly získány 4 zóny: H₁ (Et₂O) = 261,7 mg, H₂ (Et₂O) = 31,3 mg, H₃ (Et₂O) = 116,9 mg a H₄ (Et₂O) = 126,1 mg.

H₂ (Et₂O) = 31,3 mg. Byla izolována 1 látka **LT01** (m = 31,3 mg).

H₄ (Et₂O) = 126,1 mg bylo naneseno na 7 komerčních desek o velikosti 20 × 10 cm a dvakrát vyvíjeno ve vyvíjecí směsi S7, následně dvakrát ve vyvíjecí směsi S8. Byly separovány tři zóny: H₄ A (Et₂O) = 15,4 mg, H₄ B (Et₂O) = 33,6 mg a H₄ C (Et₂O) = 34,8 mg. Dále byly zpracovány pouze H₄ B (Et₂O) a H₄ C (Et₂O).

H₄ B (Et₂O) = 33,6 mg bylo naneseno na 2 komerční desky 20 × 10 cm, které byly vyvíjeny nejdříve ve vyvíjecí směsi S7 a poté dvakrát ve směsi S3 a dále byla separována jedna zóna: H₄ B (Et₂O) = 16,6 mg. Toto množství bylo naneseno na jednu komerční desku 20 × 10 cm a vyvíjeno nejdříve 4× ve vyvíjecí směsi S9 a poté 10× ve směsi S10. Byla izolována látka **LT02** (m = 14,1 mg).

H₄ C (Et₂O) = 34,8 mg bylo také naneseno na 2 komerční desky 20 × 10 cm a ty byly vyvíjeny ve vyvíjecí směsi S7. Byla izolována látka **LT03** (m = 19,1 mg).

4.3.3.2 H (EtOAc)

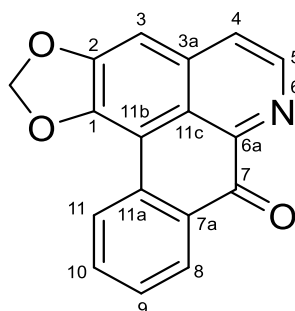
Jako poslední byla zpracovaná podfrakce H (EtOAc) = 180,0 mg. Toto množství bylo naneseno na 4 desky o velikosti 15 × 15 cm. Desky byly vyvíjeny nejdříve ve vyvíjecí soustavě S6 a poté v S7. Byla získána pouze jedna zóna H (EtOAc) = 37,4 mg. Toto množství bylo naneseno na 2 komerční desky 20 × 10 cm a ty byly vyvíjeny nejdříve dvakrát ve vyvíjecí směsi S11 a poté dvakrát ve vyvíjecí směsi S7. Byla izolována látka **LT04** (m = 23,3 mg).

5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných alkaloidů

5.1.1 LT01: Liriodenin

sumární vzorec: C₁₇ H₉ N O₃



Obrázek 20 Liriodenin

5.1.1.1 MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 275(M⁺, 100), 246(17), 217(7), 188(24), 162(13).

5.1.1.2 NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,90 (1H, d, J = 5,5 Hz, H-5), 8,67 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-11), 8,60 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 7,76 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-10), 7,59 (1H, t, J = 15,5 Hz, H-9), 7,20 (1H, s, H-3), 6,38 (2H, s, -O-CH₂-O-).

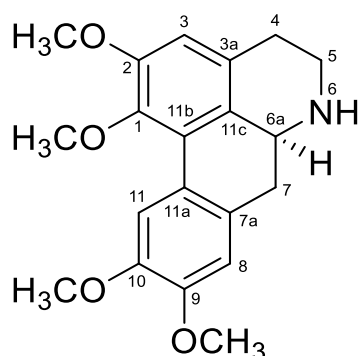
¹³C NMR (125 MHz, CHCl₃): δ 180,0 (C-7), 152,5 (C-2), 147,3 (C-1), 146,4 (C-3a), 145,3 (C-5), 135,1 (C-6a), 134,0 (C-10), 132,8 (C-11a), 131,1 (C-7a), 129,1(C- 9), 128,4 (C-8), 127,4 (C-11), 124,1 (C-4), 123,3 (C-1b), 103,3 (C-3), 102,0 (-O-CH₂-O-).

5.1.1.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost nebyla měřena z důvodu absence chirálního centra.

5.1.2 LT02: (+)-Norglaucin

sumární vzorec: C₂₀ H₂₃ N O₄



Obrázek 21 (+)-Norglaucin

5.1.2.1 MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 339(M⁺, <1), 324 (62), 293 (12), 281 (8), 266 (23), 250 (4), 238 (5), 195 (6), 169 (11).

MS (ESI): m/z (%) = 342 ([M+H]⁺100).

MS² 342 (ESI): = 325 (100), 294 (3), 310 (3).

5.1.2.2 NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8,02 (1H, s, H11), 6,87 (1H, s, H8), 6,72 (1H, s, H3), 3,87 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,85 (3H, s, OCH₃), 3,78 (1H, dd, J = 13,8 Hz, J = 4,1 Hz, H6a), 3,64 (3H, s, OCH₃), 3,37-3,33 (1H, m, H5), 3,10-2,94 (2H, m, H5, H4), 2,81 (1H, dd, J = 13,8 Hz, J = 4,1 Hz, H7), 2,74 (1H, d, J = 14,1 Hz, H4), 2,65 (1H, t, J = 13,8 Hz, H7).

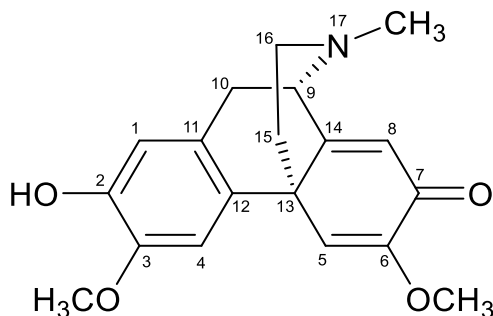
¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 153,9 (C2), 149,9 (C9), 149,0 (C10), 145,9 (C1), 130,3 (C7a), 129,9 (C3a), 127,7 (C11c), 127,6 (C11b), 125,8 (C11a), 113,6 (C11), 112,6 (C8), 112,4 (C3), 60,5 (OCH₃), 56,7 (OCH₃), 56,4 (OCH₃), 56,4 (OCH₃), 54,7 (C6a), 43,6 (C5), 36,8 (C7), 29,0 (C4).

5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = 86,1^\circ$ ($c = 0,144$; MeOH).

5.1.3 LT03 + LT04: (-)-Pallidin

sumární vzorec: C₁₉ H₂₁ N O₄



Obrázek 22 (-)-Pallidin

5.1.3.1 MS analýza

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 327(M⁺, 100), 312(53), 296(4), 283(10), 270(16), 258(14), 239(7), 227(13), 152(6).

5.1.3.2 NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6,78 (1H, s, H4), 6,71 (1H, s, H1), 6,37 (1H, s, H8) 6,35 (1H, s, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃), 3,80 (3H, s, OCH₃), 3,93-3,77 (1H, m, H9), 3,54-3,36 (1H, m, H10), 3,18-3,05 (1H, m, H10), 2,85-2,66 (2H, m, H16), 2,56 (3H, s, NCH₃), 2,09-1,96 (1H, m, H15), 1,94-1,84 (1H, m, H15).

¹³C NMR (125 MHz, CHCl₃): δ 180,5, 159,4, 151,5, 145,9, 145,1, 129,1, 128,4, 123,2, 118,5, 113,6, 107,5, 60,9, 56,1, 55,2, 45,7, 42,0, 41,3, 40,2, 32,5.

5.1.3.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -18,8^\circ$ (c = 0,1492; CHCl₃).

5.2 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP

Tabulka 4 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů

Alkaloid	IC ₅₀ [μM]		
	AChE	BuChE	POP
liriodenin	3744,33 ± 387,43	1531,0 ± 356,79	> 790*
norglaucin	3771 ± 1230	8032 ± 1671	n. a.
pallidin	717,90 ± 79,33	220,14 ± 15,78	589,7 ± 54,1
Standardy			
fyzostigmin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	-
bajkalin	-	-	194,1 ± 14,3
Z-pro-prolinal	-	-	2,8 × 10 ⁻³ ± 2,2 × 10 ⁻³

* roztok se kalil

n. a. – látka nebyla analyzována z důvodu izolace nedostatečného množství

6 DISKUZE

Extrakt ze dřeva druhu *Liriodendron tulipifera* L. byl pomocí sloupcové chromatografie separován do devíti frakcí A–I. V rámci této diplomové práce byla zpracována frakce H, ze které byly izolovány tři alkaloidy. Alkaloidy liriodenin (LT01) oxoaporfinového typu a (+)-norglaucin (LT02) aporfinového typu byly již dříve z liliovníku izolovány [51]. (-)-Pallidin (LT03 + LT04) homomorfinanového typu byl z liliovníku izolován poprvé.

Alkaloid liriodenin se dá považovat za taxonomický znak celé čeledi Magnoliaceae, byl popsán jak u liliovníku, tak i u šácholanů [79]. Tento alkaloid byl také izolován z *Beilschmiedia alloiophylla* (Rusby) Kosterm. a *Beilschmiedia kunstleri* Gamble (Lauraceae) [59], *Cissampelos sympodialis* Eichler (Menispermaceae) [72] a *Houttuynia cordata* Thunb. (Saururaceae) [75]. Také se vyskytuje poměrně hojně v čeledi Annonaceae: *Fissistigma glaucescens* (Hance) Merr. [71], *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson [66], *Unonopsis buchtienii* R.E. Fr. [70], *Annona cherimola* Mill. [73]. Byl izolován i z *Xanthorhiza simplicissima* Marshall (Ranunculaceae), z této čeledi byl liriodenin izolován již vícekrát [80].

(+)-Norglaucin byl kromě čeledi Magnoliaceae izolován z *Pseuduvaria* (Annonaceae) [81]. Pallidin byl poprvé izolován z *Corydalis pallida* (Thunb.) Pers. (Papaveraceae) [82].

Získané alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám AChE a BuChE a na inhibiční aktivitu vůči POP.

Inhibiční aktivita všech alkaloidů vůči AChE byla nevýznamná, což je v rozporu s výsledky výzkumu z roku 2012, kdy bylo zjištěno, že liriodenin má srovnatelnou inhibiční aktivitu s huperzinem A, $IC_{50} = 3,5 \pm 1,0 \mu M$ [59]. Ve srovnání se získanými výsledky, $IC_{50} = 3744,33 \pm 387,43 \mu M$, se jedná o rozdíl tří řádů. Tento markantní rozdíl může být způsobený např. jiným zdrojem AChE, avšak data o původu AChE bohužel nejsou dostupná. Jelikož byl v této práci jako zdroj AChE použit lidský hemolyzát, bylo by pro porovnání vhodné stanovit také aktivitu vůči AChE získanou z elektrického úhoře, protože bývá často používána ve studiích AChE účinků přírodních látek některými pracovními skupinami. Tento rozdíl by mohl být předmětem dalšího prozkoumání. U (+)-norglaucinu a (-)-pallidinu není možné naměřené hodnoty porovnat s literaturou, oba alkaloidy jsou ale neúčinné. Stejně tak se nedají s literaturou porovnat naměřené hodnoty inhibiční aktivity vůči BuChE. Vůči tomuto enzymu nevykazuje ani jeden z alkaloidů významné inhibiční účinky, i přes to, že u pallidinu byla aktivita řádově vyšší.

Izolované alkaloidy nevykazovaly aktivitu ani vůči POP, (+)-norglaucin nebyl měřen, z důvodu jeho nedostatečného izolovaného množství. U liriideninu nebylo možné hodnotu IC_{50} přesně vypočítat, protože se při vyšších koncentracích roztok kalil.

Závěrem lze konstatovat, že ani jedna z izolovaných látek nemá vlastnosti, které by se potenciálně daly využít v léčbě AD.

7 ABSTRAKT

Hrušková M.: Alkaloidy dřeva druhu *Liriodendron tulipifera* L. a jejich aktivita vůči lidským cholinesterasám. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2018.

Klíčová slova: *Liriodendron tulipifera*, alkaloidy, biologická aktivita.

Ze dřeva druhu *Liriodendron tulipifera* L. byly izolovány alkaloidy a byla zkoumána jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase a propyl oligopeptidase, což jsou enzymy zapojující se do patofyziologie Alzheimerovy choroby (AD). Hledání a testování nových látek, které by se uplatnily v léčbě AD, je velmi aktuální, neboť tuto nemoc zatím nelze kauzálně léčit.

Alkaloidní extrakt ze dřeva *Liriodendron tulipifera* L. byl předběžně testován na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám. Jelikož vykazoval inhibiční aktivitu, byl vybrán k izolaci alkaloidů a k jejich dalšímu zkoumání.

Separace extraktu byla provedena pomocí sloupcové chromatografie se stupňovitou elucí. Pro izolaci alkaloidů byla používána preparativní TLC. Identifikace alkaloidů probíhala pomocí strukturních analýz (NMR a MS), u opticky aktivních látek byla měřena jejich optická otáčivost. K testování látek na jejich inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase byla vybrána modifikovaná Ellmanova metoda. Inhibiční aktivita propyl oligopeptidasy byla měřena spektrofotometricky. Výsledky byly porovnané s literaturou.

Byly izolovány 3 alkaloidy: liriodenin oxoaporfinového typu, (+)-norglaucin aporfinového typu a (-)-pallidin homomorfinanového typu, poslední zmíněný byl z liliovníku izolován poprvé. Žádný z alkaloidů nevykazoval významnou aktivitu vůči lidským cholinesterasám ani vůči propyl oligopeptidase.

8 ABSTRACT

Hrušková M.: Alkaloids from the wood of the species *Liriodendron tulipifera* L. and their activity against human cholinesterase. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2018.

Key words: *Liriodendron tulipifera*, alkaloids, biological activity.

The alkaloids from the wood of the species *Liriodendron tulipifera* L. were isolated and their inhibitory activity against acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and propyl oligopeptidase, which are enzymes involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD), was investigated. The search and testing of new substances, which are used in AD treatment, is very relevant, as this disease cannot be casually treated yet.

An alkaloid extract of *Liriodendron tulipifera* L. wood was tested in a preliminary testing for inhibitory activity against human cholinesterase. Because of the promising results, it was chosen for an isolation and identification of possible effective alkaloids.

The extract was carried out by column chromatography with a step gradient elution. A preparative TLC was used to isolate alkaloids. The identification of alkaloids was done by structural analyses (NMR and MS). Optically active substances were measured for their optical rotation. A modified Ellman's method was used for testing of compounds for their inhibitory activity against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The inhibitory activity of propyl oligopeptidase was measured spectrophotometrically. The results were compared with the literature.

Three alkaloids were isolated: the oxoaporphine type liriodenine, the aporphine type (+)-norglaucine and the homomorphinane type (-)-pallidine. The last mentioned was isolated from the Tulip tree for the first time. None of the alkaloids showed significant activity against human cholinesterase or propyl oligopeptidase.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Vlček J., Fialová D. a kol.: *Klinická farmacie I*. GRADA PUBLISHING, Praha 2010.
- [2] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. GRADA PUBLISHING, Praha 2004.
- [3] Cortes N., Sierra K., Alzate F., Osorio E. H., Osorio E.: Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs): An Integrated Bioguided Study. *Phytochem. Anal.* 29, 217 (2018).
- [4] Othman W. N. N. W., Liew S. Y., Khaw K. Y., Murugaiyah V., Litaudon M., Awang K.: Cholinesterase inhibitory activity of isoquinoline alkaloids from three *Cryptocarya* species (Lauraceae). *Bioorg. Med. Chem.* 24, 4464 (2016).
- [5] Abdusamatov A., Ziyaev R., Yunusov S. Y.: Alkaloids of the wood of *Liriodendron tulipifera*. *Chem. Nat. Compd.* 10, 126 (1974).
- [6] Feldman R. S., Meyer J. S., Quenzer L. F.: *Principles of Neuropsychopharmacology*. SINAUER ASSOCIATES, INC., PUBLISHERS, Surdenland 1997.
- [7] http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en/, staženo 19. 3. 2018
- [8] <http://www.micromedexsolutions.com>, staženo 15. 3. 2018
- [9] Zvěřová M.: *Alzheimerova demence*. GRADA PUBLISHING, Praha 2017.
- [10] Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. GRADA PUBLISHING, Praha 1998.
- [11] Lambert J. C., Ibrahim-Verbaas C. A., Harold D. a kol.: Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452 (2013).
- [12] Ferreira-Vieira T. H., Guimaraes I. M., Silva F. R., Ribeiro F. M.: Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 101 (2016).
- [13] Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurol. pro praxi* 1, 11 (2004).
- [14] Kawakubo T, Mori R, Shirotani K, Iwata N, Asai M.: Neprilysin Is Suppressed by Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylation Regulated Kinase 1A (DYRK1A) in Down-Syndrome-Derived Fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 327 (2017).
- [15] Gureje O., Ogunniyi A., Baiyewu O., Price B., Unverzagt F. W., Evans R. M., Smith-Gamble V., Lane K. A., Gao S., Hall K. S., Hendrie H. C., Murrell J. R.: APOE ε4 Is Not Associated with Alzheimer's Disease in Elderly Nigerians. *Ann. Neurol.* 59, 182 (2006).
- [16] Nathan B. P., Bellosta S., Sanan D. A., Weisgraber K. H, Mahley R. W, Pitas R. E.: Differential Effects of Apolipoproteins E3 and E4 on Neuronal Growth in Vitro. *Science* 264, 850 (1994).
- [17] <http://www.imalab.cz/kategorie/odborne-clanky.aspx>, staženo 19. 3. 2018
- [18] Hansen D. V., Hanson J. E., Sheng M.: Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* Published Online: 1 December (2017), DOI: 10.1083/jcb.201709069.
- [19] Wang C. H., Wang L. S., Zhu N.: Cholinesterase inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs as Alzheimer's disease therapies: an updated umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* 20, 4801 (2016).

- [20] Bradley-Whitman M. A., Mark A. Lovell M. A.: Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Arch. Toxicol.* 89, 1035 (2015).
- [21] Carare R. O., Hawkes C. A., Jeffrey M., Kalaria R. N., Weller R. O.: Review: Cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39, 593 (2013).
- [22] Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě alzheimerovy nemoci. *Neurol. Pro praxi* 2, 112 (2007).
- [23] Doležal M. a kol.: *Farmaceutiká chemie léčiv působících na centrální nervový systém.* UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, Praha 2013.
- [24] http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002036/WC500108581.pdf, staženo 18. 4. 2018
- [25] Khoury R., Rajamanickam J., Grossberg G. T.: An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther. Adv. Drug Saf.* 9, 171 (2018).
- [26] <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>, SPC galantamin, staženo 18. 4. 2018
- [27] <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>, SPC donepezil, staženo 18. 4. 2018
- [28] Hashimoto M., Kazui H., Matsumoto K., Nakano Y., Yasuda M., Mori E.: Does Donepezil Treatment Slow the Progression of Hippocampal Atrophy in Patients With Alzheimer's Disease? *Am. J. Psychiatry* 162, 676 (2005).
- [29] Kim G. H., Moon M., Choi J. G., Park G., Kim A. J., Hur J., Lee K. T., Oh M. S.: Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation *in vitro* and *in vivo*. 40, 23 (2014).
- [30] Vališ M., Caisberger F., Šimůnek L., Linková H.: Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia* 6, 396 (2013).
- [31] Švestka J.: Memantin – necholinergní alternativa léčby alzheimerovy a vaskulární demence. *Psychiatrie pro praxi* 3, 162 (2004).
- [32] Hung S. Y., Fu W. M.: Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *Journal of Biomedical Science* 24, 47 (2017).
- [33] Boada M., Ortiz P., Anaya F., Hernandez I.: Amyloid-targeted therapeutics in Alzheimer's disease: Use of human albumin in plasma exchange as a novel approach for abeta mobilization. *Drug News Perspect.* 22, 325 (2009).
- [34] Cohen S. I. A., Arosio P., Presto J., Kurudenkandy F. R., Biverstal H., Dolfe L., Dunning C., Yang X., Frohm B., Vendruscolo M., Johansson J., Dobson C. M., Fisahn A., Knowles T. P. J., Linse S.: A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 207 (2015).
- [35] Melone M. A. B., Dato C., Paladino S., Coppola C., Trebini C., Giordana M. T., Perrone L.: Verapamil Inhibits Ser202/Thr205 Phosphorylation of Tau by Blocking TXNIP/ROS/p38 MAPK Pathway. *Pharm. Res.* 35, 44 (2018).
- [36] Shah B. M., Misra M., Shishoo Ch. J., Padh H.: Nose to brain microemulsion-based drug delivery system of rivastigmine: formulation and *ex-vivo* characterization. *Drug Delivery*

22, 918 (2015).

- [37] Markowicz-Piasecka M., Sikora J., Szydłowska A., Skupień A., Mikiciuk-Olasik E., Huttunen K. M.: Metformin – a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Pharm. Res.* **34**, 2614 (2017).
- [38] Weinstein J. D.: A new direction for Alzheimer's research. *Neural Regener. Res.* **13**, 190 (2018).
- [39] García-Horsman J. A., Männistö P. T., Venäläinen J. I.: On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* **41**, 1 (2007).
- [40] Hannula M. J., Myöhänen T. T., Tenorio-Laranga J., Männistö P. T., Garcia-Horsman J. A.: Prolyl oligopeptidase colocalizes with α -synuclein, β -amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience* **242**, 140 (2013).
- [41] https://northernwoodlands.org/images/articles/species_tulip_tree_600.jpg, staženo 22. 3. 2018
- [42] The angiosperm phylogeny group: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* **181**, 1 (2016).
- [43] Štursa J.: *Dřeviny opadavé i stálezelené v ilustracích Věry Níčové*. AVENTINUM, Praha 2016.
- [44] Nekolová R.: *Listnaté dřeviny od A do Ž díl druhý: Laburnum – Zelkova*. KUMPÁNOVÁ, Praha 2004.
- [45] Hejný S., Slavík B.: *Květena České republiky, díl 1*. ACADEMIA, Praha 1997.
- [46] Schühly W., Khan I., Fischer N. H.: The Ethnomedicinal Uses of Magnoliaceae from the Southeastern United States as Leads in Drug Discovery. *Pharmaceutical Biology* **39**, 63 (2001).
- [47] Li W. J., Lin Y. Ch., Wu P. F., Wen Z. H., Liu P. L., Chen Ch. Y., Wang H. M.: Biofunctional Constituents from *Liriodendron tulipifera* with Antioxidants and Anti-Melanogenic Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1698 (2013).
- [48] Dickey E. E.: Liriodendrin, a New Lignan Diglucoside from the Inner Bark of Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *J. Org. Chem.* **23**, 179 (1958).
- [49] Sohn Y. A., Hwang S. A., Lee S. Y., Hwang I. Y., Kim S. W., Kim S. Y., Moon A., Lee Y. S., Kim Y. H., Kang K. J., Jeong Ch. S.: Protective Effect of Liriodendrin Isolated from *Kalopanax pictus* against Gastric Injury. *Biomol. Ther.* **23**, 53 (2015).
- [50] Ziyaev R., Abdusamatov A., Yunusov S. Y.: Alkaloids of *Liriodendron tulipifera*. *Chem. Nat. Compd.* **23**, 521 (1987).
- [51] Lee C. H., Chen H. L., Hong Z. L., Chiao-Wei Hsieh C. W., Juan S. W., Huang J. C., Wang H. M., Chen C. Y.: Chemical constituents of *Liriodendron tulipifera*. *Chem. Nat. Compd.* **49**, 398 (2013).
- [52] Hsu C. Y. H., Chen C. L.: Antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from heartwood and discolored sapwood of *Liriodendron tulipifera*. *Holzforschung* **45**, 325 (1991).

- [53] Ziyaev R., Ikramov K., Kadyrov Kh. A., Abdusamatov A.: Alkaloids of *Liriodendron tulipifera*. Chem. Nat. Compd. 27, 516 (1991).
- [54] Lange W.: Über das Vorkommen von Alkaloiden im Xylem der Holzgewächse. Holz als Roh- und Werkstoff 34, 214 (1976).
- [55] Seigler D.S.: *Isoquinoline and Benzylisoquinoline Alkaloids (Plant Secondary Metabolism)*. SPRINGER, Boston 1998.
- [56] Ziyaev R., Abdusamatov A., Yunusov S. Y.: The dynamics of the accumulation and mutual transformation of alkaloids in *Liriodendron tulipifera*. Chem. Nat. Compd. 11, 495 (1975).
- [57] Yang Z., Song Z., Xue W., Sheng J., Shu Z., Shi Y., Liang J., Yao X.: Synthesis and structure–activity relationship of nuciferine derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. Med. Chem. Res. 23, 3178 (2014).
- [58] Tsai S. F., Lee S. S.: Characterization of Acetylcholinesterase Inhibitory Constituents from *Annona glabra* Assisted by HPLC Microfractionation. J. Nat. Prod. 73, 1632 (2010).
- [59] Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A. H. A., Mukhtar M. R., Awang K., Litaudon M., Ata A.: Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. Fitoterapia 83, 298 (2012).
- [60] Hung T. M., Thuong P. T., Nhan N. T., Mai N. T. T., Quan T. L., Choi J. S., Woo M. H., Min B. S., Bae. K.: Cholinesterase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Corydalis* Tuber. Nat. Prod. Sci. 17, 108 (2011).
- [61] Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). Nat. Prod. Commun. 6, 607 (2011).
- [62] Sriprang S., Khorana N., Ingkaninan K.: Acetylcholinesterase Inhibitor from *Stephania suberosa* Forman. NU Science Journal 3, 1 (2006).
- [63] Hung T. M., Dang N. H., Kim J. Ch., Jang H. S., Ryoo S. W., Lee J. H., Choi J. S., Bae K., Min B. S.: Alkaloids from Roots of *Stephania rotunda* and Their Cholinesterase Inhibitory Activity. Planta Med. 76, 1762 (2010).
- [64] Ingkaninan K., Phengpa P., Yuenyongsawad S., Khorana N.: Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. J. Pharm. Pharmacol. 58, 695 (2006).
- [65] Clement J. A., Yoder B. J., Kingston D. G. I.: Natural Products as a Source of CNS-Active Agents. Mini-Rev. Org. Chem. 1, 183 (2004).
- [66] Woo S. H., Reynolds M. C., Sun N. J., Cassady J. M., Snapka R. M.: Inhibition of topoisomerase II by liriodenine. Biochem. Pharmacol. 54, 467 (1997).
- [67] Stévigny C., Bailly C., Quetin-Leclercq J.: Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents 5, 173 (2005).
- [68] Chiu Ch. Ch., Chou H. L., Wu P. F., Chen H. L., Wang H. M., Chen Ch. Y.: Bio-Functional Constituents from the Stems of *Liriodendron tulipifera*. Molecules 17, 4357 (2012).
- [69] Hufford Ch. D., Sharma A. S., Oguntimein B. O.: Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. Journal of Pharmaceutical Sciences 69, 1180 (1980).

- [70] Waechter A. I., Cavé A., Hocquemiller R., Bories Ch., Muñoz V., Fournet A.: Antiprotozoal Activity of Aporphine Alkaloids Isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytother. Res.* **13**, 175 (1999).
- [71] Chang W. L., Chung Ch. H., Wu Y. Ch., Su M. J.: The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia–reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric Oxide* **11**, 307 (2004).
- [72] Lorenzo V. P., Alves M. F., Scotti L., Santos S. G., Diniz M. F. F. M., Scotti M. T.: Computational Chemistry Study of Natural Alkaloids and Homemade Databank to Predict Inhibitory Potential Against Key Enzymes in Neurodegenerative Diseases. *Curr. Trends Med. Chem.* **17**, 2926 (2017).
- [73] Chaves S. K. M., Feitosa Ch. M., Araújo L. S.: Alkaloids Pharmacological Activities - Prospects for the Development of Phytopharmaceuticals for Neurodegenerative Diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **17**, 629 (2016).
- [74] Nabavi S. F., Uriarte E., Rastrelli L., Modak B., Sobarzo-Sánchez E.: Aporphines and Parkinson's Disease: Medical Tools for the Future. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 1906 (2016).
- [75] Ma Q., Wei R., Wang Z., Liu W., Sang Z., Li Y., Huang H.: Bioactive alkaloids from the aerial parts of *Houttuynia cordata*. *J. Ethnopharmacol.* **195**, 166 (2017).
- [76] Liu Ch. M., Kao Ch. L., Wu H. M., Li W. J., Huang Ch. T., Li H. T., Chen Ch. Y.: Antioxidant and Anticancer Aporphine Alkaloids from the Leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosaplana*. *Molecules* **19**, 17829 (2014).
- [77] Gupta S., Singh N., Jaggi A. S.: Alkaloids as Aldose Reductase Inhibitors, with Special Reference to Berberine. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* **20**, 195 (2014).
- [78] Karasová Žďárová J., Kuča K., Jun D., Bajgar J.: Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chem. Listy* **104**, 46 (2010).
- [79] Furmanowa M., Józefowicz J.: Alkaloids as taxonomic markers in some species of *Magnolia* L. and *Liriodendron* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* **49**, 527 (1980).
- [80] Wu Y. C., Yamagishi T., Lee K. H.: Cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Xanthorhiza simplicissima*. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* **5**, 409 (1989).
- [81] Johns S. R., Lamberton J. A., Sioumis A. A.: Alkaloids from *Pseuduvaria* species, *Schefferonitra subaequalis*, and *Polyalthia nitidissima* (Annonaceae): isolation of a new alkaloid shown to be 1,2,9,10-tetramethoxnoraporphine (norglaucine). *aust. j. chem.* **23**, 423 (1970).
- [82] Kametani T., Ihara M., Honda T.: Two new alkaloids; kikemanine and the morphinandienone-type alkaloid, pallidine, from *Corydalis* species. *J. Chem. Soc. D.* **22**, 1301 (1969).