

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

---



**Alkaloidy dřeva druhu *Liriodendron tulipifera* L. a jejich  
biologická aktivita**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

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

Hradec Králové, 2018

Anna Klíčová

## **Poděkování**

Především bych ráda poděkovala mé školitelce PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za veškerou pomoc, ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla během celé přípravy a vypracování diplomové práce. Další poděkování patří prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc., za pomoc při izolování alkaloidů a za změření jejich biologických aktivit, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter, také děkuji za stanovení inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidase Mgr. Martině Hrabinové a doc. PharmDr. Danielovi Junovi, Ph.D. z Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. V neposlední řadě také celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc během celého vypracování diplomové práce.

## **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

Anna Klíčová

Podpis .....

## Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Cíl diplomové práce .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Teoretická část .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 <i>Liriodendron tulipifera</i> L. ....</b>	<b>4</b>
3.1.1 Taxonomické zařazení .....	5
3.1.2 Charakteristika rostliny .....	5
3.1.3 Výskyt a rozšíření .....	5
3.1.4 Využití .....	6
3.1.5 Obsahové látky .....	6
3.1.6 Obsahové látky v jednotlivých orgánech.....	6
3.1.7 Biologická aktivita obsahových alkaloidů.....	14
<b>3.2 Alzheimerova choroba.....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Příznaky AD .....	18
3.2.2 Rizikové vlivy .....	18
3.2.3 Diagnóza AD .....	19
3.2.4 Patofyziologie AD.....	20
3.2.5 Léčba AD.....	22
<b>4. Experimentální část .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Použitý materiál a vybavení.....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Chemikálie .....	27
4.1.2 Rozpouštědla .....	27
4.1.3 Pufry.....	28
4.1.4 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	28

4.1.5	Chromatografické adsorbenty .....	29
4.1.6	Pomocný materiál .....	29
4.1.7	Detekční činidla .....	29
4.1.8	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE .....	30
4.1.9	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP .....	30
4.1.10	Přístroje .....	30
<b>4.2</b>	<b>Obecné postupy .....</b>	<b>31</b>
4.2.1	Příprava rozpouštědel .....	31
4.2.2	Odpařování, sušení a skladování extraktů .....	31
4.2.3	Chromatografické metody .....	32
4.2.3.1	Sloupcová chromatografie .....	32
4.2.3.2	Příprava litých desek pro tenkovrstvou chromatografii .....	32
4.2.3.3	Tenkovrstvá chromatografie .....	32
4.2.3.4	Detekce alkaloidů .....	33
<b>4.3</b>	<b>Strukturní analýza .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Hmotností analýza .....	34
4.3.2	NMR analýza .....	34
4.3.3	Optická otáčivost .....	35
<b>4.4</b>	<b>Stanovení biologické aktivity .....</b>	<b>35</b>
4.4.1	Příprava hemolyzátu a plazmy .....	35
4.4.2	Stanovení absorbance enzymových preparátů a stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči lidským cholinesterasám .....	36
4.4.3	Stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči prolyloligopeptidase .....	37
<b>4.5</b>	<b>Izolace alkaloidů .....</b>	<b>37</b>
4.5.1	Příprava alkaloidního extraktu .....	37
4.5.1.1	Čištění chloroformového výtřepku (LT-d/ChCl <sub>3</sub> -A) .....	38

4.5.1.2	Čištění předčištěného chloroformového výtřepku (LT-d/Et <sub>2</sub> O-A) .....	38
4.5.2	Sloupcová chromatografie extraktu.....	39
4.5.3	Zpracování frakce.....	41
<b>5.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Strukturní analýza alkaloidů získaných z <i>Liriodendron tulipifera</i> L. a jejich fyzikálně-chemická charakteristika .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.1</b>	<b>LTD01: (+)-Glaucin.....</b>	<b>43</b>
5.1.1.1	MS analýza.....	43
5.1.1.2	NMR analýza.....	43
5.1.1.3	Optická otáčivost.....	43
<b>5.1.2</b>	<b>LTD02: (+)-N-methylaurotetanin .....</b>	<b>44</b>
5.1.2.1	MS analýza.....	44
5.1.2.2	NMR analýza.....	44
5.1.2.3	Optická otáčivost.....	44
<b>5.1.3</b>	<b>LTD03: (+)-Retikulin.....</b>	<b>45</b>
5.1.3.1	MS analýza.....	45
5.1.3.2	NMR analýza.....	45
5.1.3.3	Optická otáčivost.....	45
<b>5.2</b>	<b>Inhibiční aktivita alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP.....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Abstrakt .....</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>51</b>

## Seznam zkratek

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
CaMK II	kalmodulin kinasa II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
ERK	extracelulární signálně regulovaná proteinkinasa
GIT	gastrointestinální trakt
ChAT	cholin acetyltransferasa
IC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
MS (EI)	hmotnostní smektrometrie s elektronovou ionizací
MS (ESI)	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
MT's	konformace mikrotubulů (conformation of microtubules)
NFTs	neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-asparagová kyselina
PKC	proteinkinasa C
PPAR $\gamma$	receptory aktivované proliferátory peroxizómů (peroxisome proliferator-activated $\gamma$ )
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)

## Přehled obrázků

Obrázek 1. <i>Liriodendron tulipifera</i> L. [3].....	4
Obrázek 2. Donepezil.....	22
Obrázek 3. Rivastigmin .....	23
Obrázek 4. Galanthamin .....	23
Obrázek 5. Huperzin A .....	24
Obrázek 6. Takrin.....	24
Obrázek 7. Memantin.....	24
Obrázek 8. Sumární alkaloidní chloroformový výtřepek <i>Liriodendron tulipifera</i> L. ....	38
Obrázek 9. Přečištěné alkaloidní chloroformové a etherové výtřepky.....	39
Obrázek 10. TLC chromatogramy frakcí .....	41
Obrázek 11. TLC chromatogram frakce I po vytřepávání .....	41
Obrázek 12. (+)-Glaucin .....	43
Obrázek 13. (+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin .....	44
Obrázek 14. (+)-Retikulin .....	45



## **Přehled tabulek**

Tabulka 1. Chemické strukturní typy a vzorce látek izolovaných z <i>L. tulipifera</i> .....	13
Tabulka 2. Inhibice AChE a BuChE .....	14
Tabulka 3. Frakce získané sloupcovou chromatografií.....	40
Tabulka 4. Biologická aktivita izolovaných alkaloidů.....	46

## 1. Úvod

Lidé používali rostliny k léčbě různých nemocí již odpradávná. Dříve však nebyla známa podstata účinku rostlin ani nemocí a tak bylo jejich využití zakládáno pouze na empirických znalostech. S postupem času se rozvíjely vědomosti o podstatě chorob a jejich terapii. Léčitelé tak začali rostliny různě kombinovat, upravovat a zpracovávat do rozličných lékových forem. Již Galén (163 př.n.l.) učil, že kdo pracuje s léčivou musí je znát, také musí ovládat způsob jejich izolace a jejich převedení do lékové formy. Dalším velkým přínosem byl v průběhu 16. století Paracelsus, který započal chemizaci farmacie. Přelom pro farmacii ale nastal s 19. stoletím, kdy nové laboratorní metody umožnily izolovat čisté látky, začaly první pokusy s obměňováním jejich chemické struktury a začala se rozšiřovat výroba syntetických organických molekul. [1]

Přes veškeré možnosti chemické syntézy molekul, jsou stále přírodní léčiva nejvýznamnějším zdrojem léčivých látek a nových molekul. I přes intenzivní výzkum zůstává mnoho rostlin fytochemicky neprozkoumáno, a proto lze předpokládat, že ještě lze objevit nové účinné molekuly.[1]

Rostliny jsou využívány ve farmacii jako zdroj primárních a zejména sekundárních metabolitů. Některé z těchto sekundárních metabolitů našly ve farmacii uplatnění jako kognitiva, která jsou využívána pro léčbu Alzheimerovy choroby (Alzheimer's disease, AD). U tohoto onemocnění hrají důležitou úlohu lidské cholinesterasy, které odbourávají neurotransmitter acetylcholin (ACh). V průběhu AD totiž dochází ke snížení hladin ACh, a proto se pro jeho terapii využívá látek, které dokážou inhibovat lidské cholinesterasy, jelikož tím se zvyšuje hladina ACh v neuronální štěrbině. [2] Bohužel zatím nebyla nalezena léčivá látka, která by dokázala vyléčit toto onemocnění, ale pouze takové léčivé látky, které umožní postup nemoci zpomalit a zlepšit kvalitu života nemocného. Proto neustále probíhá výzkum nových léčivých látek. Jedním z hlavních zdrojů nových léčivých látek jsou rostliny. Rostliny obsahují obrovské množství chemických sloučenin s různou biologickou aktivitou a je zde tedy velká pravděpodobnost, že by některé mohla zasahovat do patofyziologie AD.

Předběžné testy u alkaloidního extraktu dřeva *Liriodendron tulipifera* L. prokázaly aktivitu vůči cholinesterasám (vůči acetylcholinesterase, AChE,  $IC_{50}=342,91 \pm 31,95 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; u

butyrylcholinesterasy, BuChE  $IC_{50} = 65,01 \pm 5,94 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), a proto byla tato rostlinná droga vybrána k dalšímu zkoumání.

## 2. Cíl diplomové práce

***Cílem této práce bylo:***

- zpracování literární rešerše o *Liriodendron tulipifera* L.
- výběr vhodných metod pro izolaci alkaloidů
- vlastní izolační práce
- stanovení fyzikálně-chemických vlastností čistých alkaloidů
- vyhodnocení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči lidským cholineseterasám a prolyloligopeptidase.

### 3. Teoretická část

#### 3.1 *Liriodendron tulipifera* L.



Obrázek 1. *Liriodendron tulipifera* L. [3]

Český název: **liliovník tulipánokvěť** (Dostál 1989, Kubát 2002)

Synonyma: liliovník čtyřlaločný (Presl 1823), liliovník obecný (Presl 1846)

### 3.1.1 Taxonomické zařazení

Třída:	Magnoliopsida
Řád:	Magnoliales
Čeleď:	Magnoliaceae
Rod:	<i>Liriodendron</i>
Druh:	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.

### 3.1.2 Charakteristika rostliny

*Liriodendron tulipifera* L. je středně vysoký, rychle rostoucí, mohutný strom. Patří do čeledi Magnoliaceae (šácholanovité), která se řadí mezi opadavé dřeviny. Průměrně *L. tulipifera* dosahuje výšky 7 až 13 m, v půdní oblasti svého výskytu dorůstá až do výšky až 60 m. [4]

*Liriodendron tulipifera* L. má přímý kmen, nejprve s hladkou a šedohnědou borkou, která se později mění na černou a hluboce brázditou borku. Strom má zvoncovité květy, které mohou být až 6 cm dlouhé, květní obaly má rozlišené a korunní listy zelenožluté s oranžovými proužky, kališní lístky jsou rovnovážně odstáté až nazpět ohnuté, korunní lístky jsou vzpřímené. Květy kvetou jednotlivě na koncích větví v období května a června. [4]

Listy jsou dlouhé 10 až 15 cm a přibližně stejně široké, po obou stranách jsou lysé a dělí se do dvou až čtyř záhybů s přímým zakončením do špičky nebo se širokými zářezy. Na podzim se listy barví do syté žluté barvy. Řapík listů je dlouhý přibližně 10 cm. [4]

Liliovník má šiřticovité souplodí křídlatých nažek, které dorůstají délky 3 cm. Křídla nažek jsou zašpičatělá a tuhá. [4]

Koruna stromu je mohutná, vytváří široký kuželovitý tvar. [4]

### 3.1.3 Výskyt a rozšíření

Strom pochází z východní a jihovýchodní Severní Ameriky, z oblasti států Massachusetts a Wisconsin až po Floridu a Missouri. U nás je pěstován pouze jako okrasná dřevina v parcích a zahradách. V Čechách byl poprvé vysazen roku 1865 v Hluboké nad Vltavou. [5]

Jeho půdními oblastmi jsou listnaté lesy, bohaté kypré půdy v říčním údolí, ale dobře snáší i městské prostředí. Nejvíce se stromu daří na slunných místech, ale snese i polostín. [5]

### 3.1.4 Využití

Liliovník se využívá zejména pro své dřevo na výrobu nábytku, papíru, překližky atd. jelikož se dřevo snadno leští a moří. V tradičním lidovém léčení se používala kůra z mladých větví a kořenů proti horečce spojené s malárií místo chininové kůry. Původní Američané používali kůru stromu jako tonikum, stimulant a lék proti horečce. [6]

### 3.1.5 Obsahové látky

Ve všech částech rostliny byly detekovány alkaloidy. Jejich množství a obsah se liší podle části rostlinných orgánů a i podle ročního období, například největší hladina alkaloidů v listech je v jarním období, zatímco nejnižší naopak během podzimu. Některé alkaloidy vznikají při poranění stromu, tak tomu je u látek (+)-lirioferinu, (+)-liriotulipiferinu, (+)-glaucinu a s ním souvisejících fenolových alkaloidů, jako je například (+)-*N*-methyllaurotetanin. [7]

Získané látky z *Liriodendron tulipifera* mají různé biologické vlastnosti. Některé alkaloidy *L. tulipifera* například dokáží inhibovat hydroxylaci L-tyrosinu. [8] Mnoho dalších látek obsažených v *L. tulipifera* má potenciál v kosmetickém průmyslu, díky schopnosti bělit kůži, tím že sníží obsah melatoninu v buňkách. Další společnou vlastností pro některé alkaloidy je protinádorová aktivita, antioxidační schopnosti i antibakteriální funkce. [7]

Z těchto vlastností vyplývá, že látky obsažené v *L. tulipifera* by mohly mít velký potenciál v medicíně. [7]

### 3.1.6 Obsahové látky v jednotlivých orgánech

#### **Listy**

Byla již izolována řada alkaloidů z *L. tulipifera*, ze samotných listů rostliny bylo izolováno 17 látek. Jednou z nejvíce obsažených látek v listech je inositol: liriodendritol. [10]

Mezi již izolovanými látkami bylo sedm alkaloidů: (-)-anonain, (-)-norstefalagin, (-)-liridin, (+)-nornuciferin, (+)-kaaverin, (+)-lirinidin a lysikamin; jeden kumarin: skopoletin; jeden seskviterpenový lakton: epitulipinolid diepoxid; tři benzenoidy: syringaldehyd, syringová kyselina a vanilová kyselina; dvě látky steroidní struktury:  $\beta$ -sitosterol a stigmasterol. [9] Ze silic izolovaných z listů lze získat další, dvě látky typu seskviterpenových laktonů, zejména germakren D a  $\beta$ -elemen či monoterpen (*Z*)- $\beta$ -ocimen. [10]

#### **Větve**

Z methanolového extraktu malých větví bylo izolováno celkem 18 sloučenin: 3 oxoapomorfinového typu: liriodenin, atherospermidin a oxoxylopin; čtyři aporfinového typu: (-)-anonain, (-)-norglaucin, (+)-kaaverin a (+)-isolaurelin; tři lignany: (-)-eudesmin, (+)-medioresinol a (+)-syringaresinol; jeden kumarin: skopoletin; pět benzenoidů: koniferyl aldehyd, 3,4,5-trimethoxybenzoová kyselina, *p*-hydroxybenzoová kyselina, 3,4-dimethoxybenzoová kyselina a vanillová kyselina; dvě steroidní sloučeniny:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol. [11]

#### **Listy a větve**

Z methanolového extraktu listů a větví *L. tulipifera* frakcionací do *n*-hexanu a chloroformu byly izolovány 4 látky: (-)-sesamin, (-)-syringaresinol, tanegool, blumenol A.[11]

#### **Kůra**

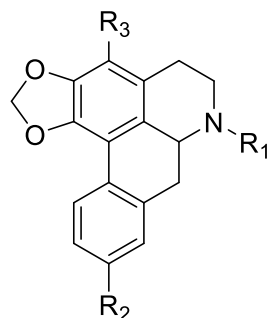
Z kůry *Liriodendron* byl získán kumarin skoparon. [10]



Přehled struktur obsahových látek je znázorněn v následující tabulce.

---

### Apomorfinové alkaloidy



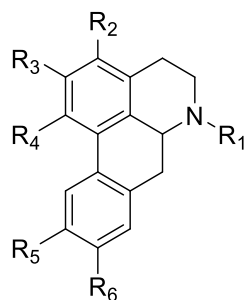
**(-)-Anonain:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=H

**(+)-Isolaurelin:** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=H

**(-)-Norstefalagin:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>

---

### Aporfinové alkaloidy



**(+)-Glaucin:** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>

**(+)-Kaaverin:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>OH; R<sub>5</sub>=H; R<sub>6</sub>=H

**(-)-Norglaucin:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub>

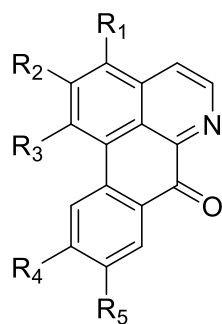
**(+)-N-methylaurotetanin:** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>6</sub>=OH

**(+)-Nornuciferin:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>=H; R<sub>6</sub>=H

---

---

### Oxoaporfinový typ

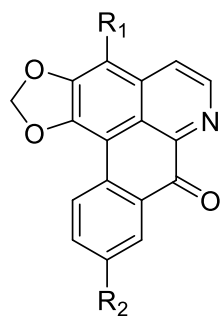


**(-)-Liridin:**  $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OCH_3$ ;  $R_4=H$ ;  $R_5=H$

**Lysikamin:**  $R_1=H$ ;  $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OCH_3$ ;  $R_4=H$ ;  $R_5=H$

---

### Oxoaporfinové alkaloidy substituované methylenedioxy- skupinou



**Aterospermidin:**  $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=H$

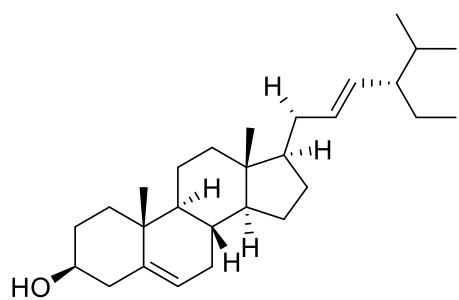
**Liriodenin:**  $R_1=H$ ;  $R_2=H$

**Oxxylopin:**  $R_1=H$ ;  $R_2=OCH_3$

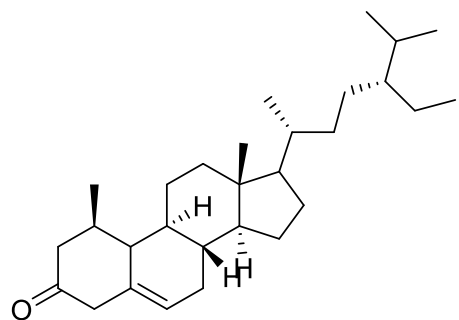
---

---

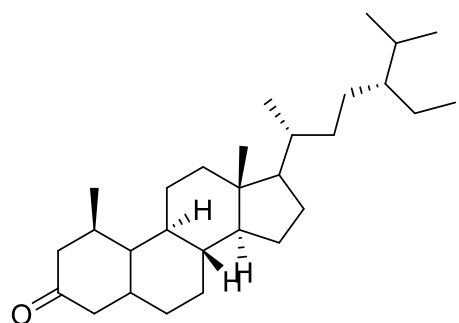
## Steroidní sloučeniny



**Stigmasterol**



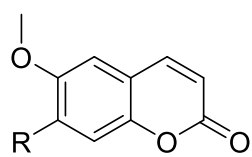
**β-Sitosterol**



**Sitostenon**

---

## Kumariny

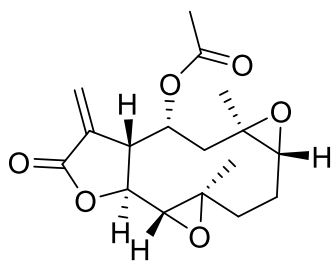


**Skoparon:** R=OCH<sub>3</sub>

**Skopoletin:** R=OH

---

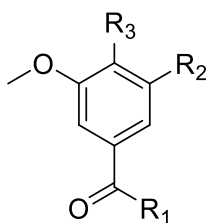
### Seskviterpenový lakton



**Epituliponolid diepoxid**

---

### Benzenoidy



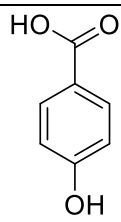
**Syringová kyselina:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=OH

**Syringaldehyd:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=OH

**Vanilová kyselina:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OH

**3,4,5-Trimethoxybenzoová kyselina:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>

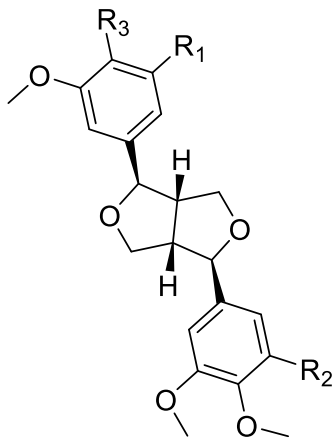
**3,4-Dimethoxybenzoová kyseliny:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>



**4-Hydroxybenzoová kyselina**

---

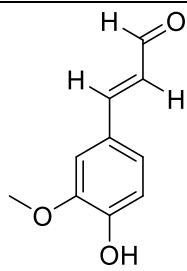
**Lignany**



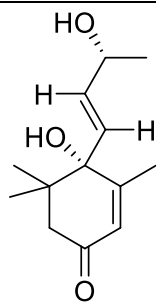
**Eudesmin:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>

**Medioresinol:** R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OH

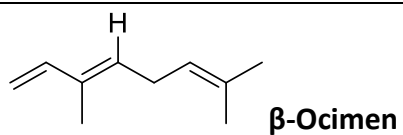
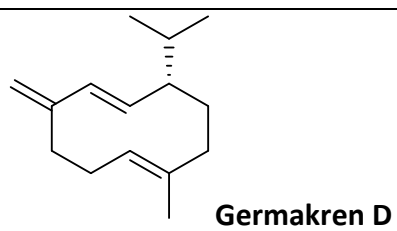
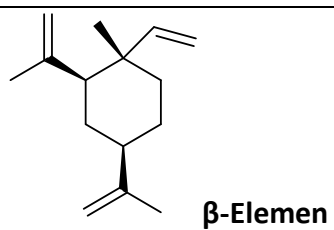
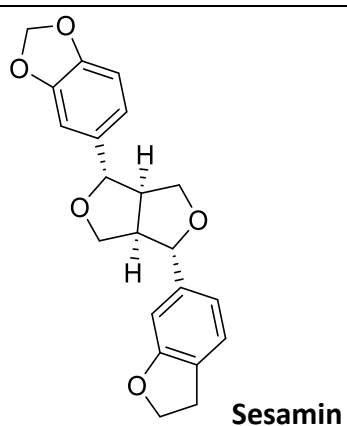
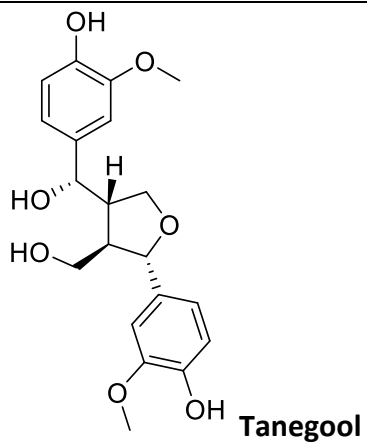
**Syringaresinol:** R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=OH



**Koniferyl aldehyd**



**Blumenol A= (+)-Vomifoliol**



---

Tabulka 1. Chemické strukturální typy a vzorce látek izolovaných z *L. tulipifera*

### 3.1.7 Biologická aktivita obsahových alkaloidů

#### Inhibiční aktivita vůči cholinesterásám

Alkaloid	IC <sub>50</sub> [μM]		Literatura
	AChE	BuChE	
Atherospermidin	-	19,34	[12]
(+)-Glaucin	89,0 ± 0,8	-	[13]
Isolaurelin	8,4 ± 1,2	>1000	[14]
Liriodenin	3,5 ± 1,0	-	[15]
Lysikamin	16,1 ± 1,5	-	[16]
(+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin	898,0 ± 10,5	>1000	[17]
Oxoxylopin	42,5 ± 2,5	-	[18]

Tabulka 2. Inhibice AChE a BuChE

#### Antiplasmodialní aktivita

Látky získané z listů a kůry prokázaly antiplasmodiální aktivitu. Aktivita se projevila u aporfinových alkaloidů (-)-norglaucin, liriodenin a (-)-anonain, izolovaných z kůry *L. tupulifera*. [18]

#### Antioxidační aktivita

Extrakty z listů a kůry jsou bohaté na antioxidanty.

(-)-Anonain, (+)-norstefalagin, (-)-liridin, (+)-glaucin, (-)-norglaucin, skopoletin, syringaldehyd, vanilová kyselina a (-)-liriodendritol jsou látky, které mají antioxidační schopnosti, chelatují kovy a mírně redukovat železo. [8,20]

#### Inhibice proliferace melanomu

Látky liriodenin, (-)-norglaucin, (+)-glaucin a (-)-anonain značně inhibují proliferaci buněk melanomu. [8]

Seskviterpenový lakton epitulipinolid diepoxid silně inhibuje buňky melanomu s minimální schopností redukovat železo. [20]

#### Protinádorové vlastnosti

Slice z listů a methanolvý extrakt z liliovníku prokázal protinádorovou aktivitu. [12] Protinádorové účinky se projevily zvláště na schopnosti inhibovat migraci, tím prokazují slibné vlastnosti jako chemoprotektivní činidla pro buňky melanomu lidské pokožky. [8]

### **Inhibice proliferace jaterních hvězdčovitých buněk**

Inhibice proliferace jaterních hvězdčovitých buněk (hepatic stellate cell, HSC) je považována za efektivní terapeutický cíl léčby fibrózy. Methanolový extrakt listů a větvíček vykazuje signifikantní inhibiční aktivitu proti proliferaci HSC. (-)-Syringaresinol, salvinal vykazují selektivní antifibrotický účinek proti aktivovanému HSC a potlačují produkci TNF- $\alpha$  v makrofázích.[21]

### **Antibakteriální aktivita**

Silice získané z listů vykazují *in vitro* antibakteriální účinnost proti *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*. [10]

Antimikrobiální účinky jsou pozorovány i u látek dehydroglaucinu a liriodeninu. Látky působí proti *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* a *Aspergillus nige*. [21]

### **(+)-Norstefalagin**

(+)-Norstefalagin má relaxační účinek u kryš na děložní hladkou svalovinu. [19]

### **Lirinidin**

Studie prokázaly schopnost lirinidinu inhibovat kolagen, kyselinu arachidonovou a agregaci trombocytů vyvolanou aktivací destiček. [20]

### **Skoparon**

Při koncentraci 200  $\mu$ M zřetelně podporuje kumarin skoparon růst neuritů. Při této koncentraci také zvyšuje růst neuritů z buněk v přítomnosti nervového růstového faktoru. Také zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP a Ca<sup>2+</sup>. Navíc skoparon při koncentraci 200  $\mu$ M zvýšil aktivitu extracelulární signálně regulované proteinkinasy (ERK), cyklické AMP-dependentní proteinkinasy (PKA), protein kinázy C (PKC) a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinasy II (CaMK II).[21]

Bohužel skoparonem indukovaný růst neuritů je blokován mitogen-aktivovaným inhibítorem proteinkinázy, PKA inhibítorem, PKC inhibítorem a CaMK II inhibítorem.[21]

### **(+)-Glaucin**



(+)-Glaucin je alkaloid, který nejen pomáhá při hojení ran, ale také účinkuje na průdušky. Je antagonistou  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu, selektivně inhibuje fosfodiesterasu 4 a tím dochází k relaxaci hladkého svalstva průdušek. [22]

Kromě toho (+)-glaucin působí na další receptory v těle, je slabým antagonistou dopaminových receptorů, antagonistou periferních serotoninových receptorů, neselektivní antagonistou  $\alpha$ -adrenoreceptorů. Má také antioxidační vlastnosti a vykazuje protinádorové vlastnosti. Díky svým účinkům na mozkové receptory způsobuje (+)-glaucin slabost, ospalost, nevolnost, mydriázu a vizuální nebo disociativní halucinace. [23]

### **(+)-*N*-methyllaurotetanin**

Tento alkaloid působí na srážení krve. Silně inhibuje agregaci trombocytů způsobenou arachidonovou kyselinou, také inhibuje agregaci krevních destiček vyvolaných kolagenem a brání agregaci trombocytů inhibicí faktoru aktivujícího krevní destičky, PAF. [24]

Mimo tyto vlastnosti působí i antivirově.[18] Snižuje hyperpigmentaci kůže díky dobré vazbě na tyrozinázu, vykazuje dobré vlastnosti pro průnik kůží a má minimální potenciál pro sensibilizaci a podráždění pokožky.[26]

## 3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je nejčastější formou demence, tvoří 50 až 75 % veškerých typů demence v různých věkových skupinách.[27] Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které je spojené s kognitivní poruchou až demencí, velmi rychle se zhoršuje a vždy je smrtelná.[28] Jedná se o mnohonásobné kognitivní vady nebo poruchy výkonných funkcí, které vedou k zhoršení pracovních či sociálních schopností. [29]

Kompletní etiologie AD ještě není zcela prozkoumána, ale je známo několik faktorů, které souvisejí s rozvojem tohoto onemocnění. Mezi tyto faktory patří snížená hladina acetylcholinu, agregace  $\beta$ -amyloidu, hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu, oxidativní stres a zánět. [30]

AD má dvě formy: ranou, která začíná ve věku do šedesáti let a má rychlejší průběh (trvá šest až osm let), a pozdní, které se projevuje nad šedesát let a její průběh je obvykle delší (i přes deset let).[31]

Incidence onemocnění roste s věkem a ve vyšším věku jsou dvakrát více ohroženy ženy než muži. Přisuzuje se to částečně i tomu, že se ženy dožívají vyššího věku, ale přesný důvod není znám. [29]

Z větší části postihuje muže a ženy starší 65 let a vždy končí letálně, muži umírají dříve než ženy. V ČR trpí Alzheimerovou chorobou na 70 000 lidí. Demence se obvykle projeví u 5% až 8 % lidí nad 65 let, 15 % až 20 % nad 75 let a 25 % až 50 % nad 85 let. Jedná se o sedmou nejčastější příčinu úmrtí v USA. Délka života pacientů při vyvinutí AD je velmi variabilní, může se jednat o dva roky i o dvě desetiletí. Průměrná délka je 8 až 11 let. Pacienti s AD často umírají díky polymorbiditě. Pneumonie či sepse je častou příčinou mortality, nebo také malnutrice. [29]

V roce 2010 trpělo tímto typem demence okolo 35 milionu lidí po celém světě, každý rok přibývá 4,6 milionů nových případů. Odhaduje se, že počet případů se bude každých dvacet let zdvojnásobovat, takže do roku 2030 by na světě bylo přes 65 milionů lidí trpících AC. 60 % pacientů s demencí se vyskytuje ve vývojových zemích, toto číslo se do roku 2040 zvýší pravděpodobně až na 71%. Rychlost výskytu onemocnění je v rozvojových zemích 3 až 4 krát větší než ve vyspělých zemích. [31]

### 3.2.1 Příznaky AD

Toto onemocnění způsobuje kognitivní dysfunkce, což zahrnuje nejčastěji agnozii, poruchu schopnosti zpracovávat smyslové (senzorické) informace, apraxii, neboli pacient ztrácí schopnost vykonávat koordinované, účelné i naučené pohyby a dysfázii, neschopnost uspořádat slova smysluplným způsobem. [31]

Příznaky se objevují pomalu, proto ze začátku není jednoduché je odlišit od klinicky normálních příznaků stárnutí. Prvním příznakem zpravidla bývá porucha krátkodobé epizodické paměti s charakteristickým zapomínáním každodenních činností. Postupně pacient má problém s vybavením právě naučených informací a poruchu konfrontačního pojmenování. Dochází k změně mluvy, řeč je sice plynulá, ale význam slovních spojení je nejasný a nemocní sami často hledají slova. Nemocní začínají bloudit, nemohou najít cestu domů, zapomínají cestu na místa, kam chodili dříve pravidelně bez obtíží. Nemoc začne postupně postihovat exekutivní funkce vázané na čelní laloky, nemocní přestávají být schopni plánovat a organizovat jednotlivé činnosti. [31]

U 40 % pacientů se projevují poruchy nekognitivních funkcí, jako je agresivita, deprese.[31]

Častým znakem přechodu z mírného do středního stupně choroby je deprese, poruchy spánku.[31]

V pokročilé fázi onemocnění klesá schopnost pacientů komunikovat s okolím. Pacienti jsou apatičtí, přestávají poznávat své blízké. Ke konci života už nejsou schopni ani udržovat kontakt s lidmi, kteří o ně pečují, jsou inkontinentní a ztrácí schopnost řeči. [31]

### 3.2.2 Rizikové vlivy

AD je dědičná choroba, i u takzvaných ojedinělých případů. Genetická dispozice pro AD je nejlépe pochopena u raných forem AD, které čítají méně než jedno procento případů. Typicky vychází z autosomální dominantní dědičnosti, která souvisí s mutacemi v genech, které mění produkci, agregaci, nebo clearance bílkoviny  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ).[32] Zejména riziko genové mutace na chromozomech 21, 14, 1.[31]

Pozdní forma má genetickou dispozici složitější, přičemž náchylnost k projevu nemoci pravděpodobně přináší řada běžnějších genetických faktorů, jako jsou alely apolipoproteinu E

(APOE), které interagují s environmentálními a epigenetickými vlivy.[32] Rizikovým faktorem je alela  $\epsilon$ -4-genu pro APOE, lokus na 12. chromozomu a možná i mutace mitochondriální DNA. [31]

Mezi další faktory patří poranění hlavy, mozková mrtvice, hypercholesterémie [28], věk, nižší vzdělání a kouření cigaret. [31]

Rizikové faktory pro vaskulární onemocnění, včetně hypertenze, obezity a diabetu, mohou také zvýšit riziko vzniku AD, zvláště pokud jsou přítomny v období středního věku.

Také sociální, duševní a fyzická aktivita jsou nepřímo spojena s rizikem vzniku AD a jiných forem demencí.[33]

### **3.2.3 Diagnóza AD**

Klinická diagnóza nemoci se zakládá na mezinárodně doporučených kritériích skupiny NINCDS/ADRDA z roku 1984. Tyto kritéria rozlišují diagnózu na pravděpodobnou, která se uvádí u případů s typickými klinickými příznaky, možnou, které se uvádí v případech s atypickými příznaky nebo pokud pacient trpí současně dalšími systémovými chorobami a jistou, která je dána histologicky. Součástí je i neuropsychologické testování. [31]

Klinická kritéria pro AD jsou založena na historii počátku projevení nemoci a směru onemocnění, vyloučení dalších etiologií a dokumentace kognitivních vad v jedné nebo ve více oblastech. [34]

Dalším diagnostickým vyhodnocujícím prostředkem je The Montreal Cognitive Assessment, je velmi citlivý na řídicí a jazykové dysfunkce. [34]

Neuropsychologické testování je nápomocné při individuálním vyhodnocování kognitivních vad a demence. Je důležité pro vytvoření výchozího bodu ke sledování pacienta v časovém průběhu. K rozlišení mezi různými neurodegenerativními demencemi nebo mezi nonneurodegenerativními demencemi a dalšími etiologiemi kognitivních vad. K posouzení kompetencí a řídit doporučení týkající se řízení dopravních prostředků, finančních rozhodnutí a potřeby pro dohled nad pacientem s AD. [34]

### 3.2.4 Patofyziologie AD

Neurobiologické změny u Alzheimerovy choroby se projevují různými formami. Jednou z nich je lokalizovaná ztráta neuronů zejména v hippocampu a mozkové kůře, a také globální atrofie mozku. Čím větší objem mozku má dotyčný premorbidní, tím větší zůstává rezerva pro uchování kognitivních funkcí v průběhu nemoci. Během nemoci také dochází ke změnám dendritických systémů včetně synapsí. Přičemž neuronové synapse atrofují v mozkové kůře nerovnoměrně. Projevy patofyziologických změn jsou jak regresivní tak progresivní. [31]

Histologické a morfologické změny mozku u pacientů s AD se projevují  $\beta$ -amyloidními extracelulárními ložisky, hyperfosforylací  $\tau$ -proteinu, tvorbou neurofibrilárních klubek uvnitř neuronů, poškození cholinergního systému, oxidačním stresem a zánětu včetně vysoké hladiny cytokinů a resistinů. [30]

Bohužel není známa přesná příčina onemocnění, byla tedy vytvořena řada hypotéz, které vycházejí ze známých patofyziologických faktorů související s onemocněním. [31]

#### Amyloidní hypotéza

Charakteristickým neuropatologickým znakem AD jsou senilní plaky, což jsou nepravidelně okrouhlé, heterogenní útvary velké asi 100-200  $\mu\text{m}$ , které se skládají z  $A\beta$ . Dále jsou pro tuto chorobu typické neurofibrilární klubka (NFTs) vytvořená hyperfosforylovanými formami  $\tau$ -proteinu, degenerace nebo atrofie bazálních cholinergních neuronů v přední části mozku. [35]

U AD dochází k nadměrné produkci amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Jde o transmembránový glykoprotein typ-1 tvořený z 365-770 aminokyselin. Nejvíce se v lidských neuronálních tkáních vyskytuje isoforma APP695. APP se ve velké míře vyskytuje v lidských nervových tkáních, kde se podílí na jejich vývoji a na odpovědi na stres či poranění CNS. [35]

Při AD je APP hydrolyzován především dvěma proteasamy,  $\beta$ -sekretasou (BACE1) a  $\gamma$ -sekretasou, a postupnými reakcemi se agreguje do toxického proteinu  $A\beta$ . Dva hlavní podtypy jsou  $A\beta_{1-40}$  a  $A\beta_{1-42}$ . Kratší podtyp se vytváří hydrolýzou APP v endoplazmatickém retikulu, zatímco delší subtyp je formován v Golgiho aparátu.  $A\beta_{1-40}$  je v těle běžný a má jen malou molekulu, ale snadněji tvoří agregáty a následně i plaky. [35]

## **Neurofibrilární klubka**

Změny neurofibril se nazývají neurofibrilární klubka (NFTs). Jedná se o párová spirální vlákna s typickou periodicitou, podstatnou částí klubek je  $\tau$ -protein.  $\tau$ -protein je komponentou mikrotubulů, stabilizuje růst axonů a je důležitý pro neurity. Je to protein s nízkou molekulární hmotností, váže se na tubulin mikrotubulů a iniciuje jejich polymerizaci. Jakmile dojde k jeho defosforylaci, podílí se na jejich stabilizaci. [31]

Při AD je  $\tau$ -protein abnormálně hyperfosforylován a tvoří nerozpustné fibrily, čímž přispívá k cytoskeletálním změnám tvaru NFTs. Tato abnormální spirální struktura interferuje s normální funkcí neuronů, což vede ke smrti neuronálních buněk. Na vzniku neurálních klubek se nejspíš může také podílet ubiquitinizace a glykolýza. [31]

## **Úbytek acetylcholinu**

Acetylcholin je neurotransmitter, který vzniká z cholinu a acetylkoenzymu A díky enzymu cholinacetyltransferasa, proces probíhá v retikulární formaci. V průběhu neurotransmise je acetylcholin uvolňován do synaptické štěrbině a zde se váže na postsynaptické membráně na cholinergní receptory. Tímto procesem se vede vzruch, který mimo jiné ovlivňuje i kognitivní funkce. Při AD dochází k uplatnění zejména M1 muskarinových receptorů. V synaptické štěrbině dochází rychle k rozkladu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou, díky specifickým esterasám acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. [36]

Abnormality centrální nervové neurotransmise je nejvíce sledovaný znak u AD. Pokles acetylcholinu v synaptické štěrbině je dán nízkou aktivitou cholin acetyltransferasy (ChAT), což je specifický enzym, který je zodpovědný za syntézu ACh z cholinu a acetátu. Kromě ChAT mají vliv na cholinergní rovnováhu dva enzymy hydrolyzující ACh, acetylcholinesterasa a butylcholinesterasa [30]. Tyto dva enzymy degradují ACh v synaptické štěrbině a tím ukončují práci neurotransmiteru na postsynaptické membráně. [31]

Pro AD je typický nedostatek centrálních cholinergních neurotransmiterů, což způsobuje ztrátu paměti, změny v chování a osobnosti. [31]

### 3.2.5 Léčba AD

Prozatím neexistuje žádná léčba tohoto onemocnění, pouze včasnou diagnózou můžeme progres nemoci zpomalit a zlepšit kvalitu života nemocného. [37]

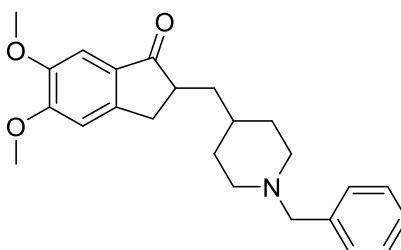
Léčba demence zahrnuje multidisciplinární přístup, který záleží na stádiu onemocnění a specifických symptomech. Kromě léčby nemocného je třeba také adekvátně vzdělat rodinu a pečovatele o přístupu k nemocnému, pozornost se upírá především na bezpečnost pacienta, na výběr vhodného léčebného zařízení a vytvoření vhodného denního programu pro nemocného. Péče o pacienta by měla být taková, aby se zachovala jeho důstojnost, pacient byl minimálně limitován a jeho schopnosti maximálně zachovány. [31]

Při volbě farmakologické terapie se vždy musí zvážit přínosy vzhledem k rizikům. Používají se léčiva zvyšující koncentraci acetylcholinu v centrálním nervovém systému (kognitiva), inhibují enzym acetylcholinesterasu, který je zodpovědný za degeneraci acetylcholinu. Tyto látky se užívají pouze u mírné nebo středně těžké formy AD. Další skupina léčiv ovlivňuje glutamátové receptory, jsou to látky antagonistující na receptorech *N*-methyl-*D*-asparagové kyseliny (NMDA). [38]

#### Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI)

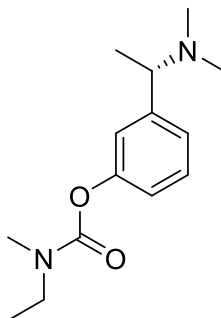
Léčiva první volby pro zlepšení a zpomalení degenerace kognitivních funkcí jsou inhibitory cholinesterasy – donepezil, galantamin, rivastigmin. Mají vyšší afinitu k centrální AChE než k periferní. AChEI zpomalují vytváření APP fragmentů. Zvyšují hladinu acetylcholinu v synaptické štěrbině tím, že redukuje její degradaci a tím zlepšují centrální aktivitu cholinu. [2]

**Donepezil** je vysoce selektivní AChEI. Zpomaluje atrofii hippocampu a ochraňuje nervové buňky. [38]



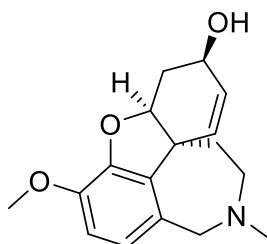
Obrázek 2. Donepezil

**Rivastigmin** je léčivo karbamátového typu, dokáže selektivně urychlit efekt acetylcholinu v mozkové kůře a hippocampu. Inhibuje AChE a BuChE a tím usnadňuje cholinergní přenos tím, že zpomaluje odbourání Ach. Rivastigmin se kovalentně váže na svůj cílový enzym, se kterým vytvoří komplex a tím tento enzym dočasně inaktivuje. [39]



Obrázek 3. Rivastigmin

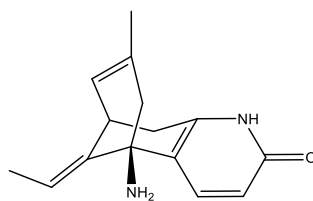
**Galantamin**, původně izolovaný z rostliny *Galanthus worrovii* Losinsk., je navíc modulátorem centrálních nikotinových receptorů. Dokáže zvýšit uvolnění ACh tím, že reguluje externí receptory pro nikotinovou kyselinu. [2]



Obrázek 4. Galanthamin

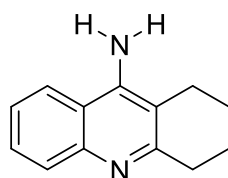
**Huperzin A** je alkaloid získaný z čínské rostliny *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, který se chová jako účinný, reverzibilní a selektivní inhibitor AChE. Mechanismus účinku je podobný donepezilu, galanthaminu a rivastigminu. Klinické testy prokázaly, že huperzin dokáže zlepšit kognitivní funkce a schopnost každodenních činností. [32] V Číně je huperzin A registrován jako léčivo pro AD, v USA je užíván jako doplněk léčby pro AD, ale bohužel v České republice chybí jeho registrace pro léčbu AD. [35] [40]





Obrázek 5. Huperzin A

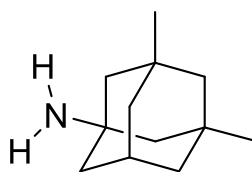
**Takrin** patří mezi první AChEI. Mechanismus účinku je komplikovaný, zahrnuje několik drah: cholinergní, gabaergní a glutaminergní. [30] Váže se na aktivní místo cholinesteras a tím je inhibuje. Bohužel byl stažen kvůli značným nežádoucím účinkům, hepatotoxicitě a nežádoucím účinkům na GIT. [38]



Obrázek 6. Takrin

### Antagonisté na NMDA receptorech

**Memantin** je středně afinitní antagonist NMDA receptorů, působící také na glutaminergní neurotransmisí, nadbytek glutamátu v synapsích totiž působí cytotoxicky a podílí se na patologickém mechanismu AD. [28] Memantin se používá u pacientů se střední až závažnou formou AD. [2]



Obrázek 7. Memantin

### Potenciální nová léčba

#### Anti-amyloidní terapie

Podle amyloidové hypotézy, jsou právě A $\beta$  oligomery pro pacienty s AD příčinou úmrtí. Současný výzkum se proto soustředí na potlačení funkce  $\beta$ -sekretasy a  $\gamma$ -sekretasy. Rosiglitazon a pioglitazon, perorální léčiva pro léčbu diabetes mellitus 2. typu, se chovají jako inhibitory  $\beta$ -sekretasy, stimulováním receptorů aktivovaných peroxizómovými proliferátory

(peroxisome proliferator-activated  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ). Terapeutický efekt agonistů PPAR $\gamma$  u AD je nejspíš dán jejich účinkem na inzulin, zvýšení citlivosti tkání pro inzulin a snížení koncentrace inzulinu ve tkáních.[35]

Díky těmto poznatkům jsou teď středem výzkumu A $\beta$  protilátky. Aktivní a pasivní imunizace by mohla pomoc předcházet vzniku AD. Terapie by spočívala v aktivní imunizaci, injekčně podávaného syntetického A $\beta$  peptidu, A $\beta$  fragmentu navázaného na nosný protein, což by stimulovalo hostitelskou buňku v produkci protilátek proti A $\beta$ . Popřípadě pasivní imunizací, přímým očkováním specifických A $\beta$  protilátek, tak aby došlo k aktivaci imunitního systému hostitele.[35]

Předmětem výzkumu jsou i monoklonální protilátky, jako například bapineuzumab (AAB-001) a solanezumab (LY2062430), nebo také genová imunoterapie, A $\beta$ -DNA vakcína kódovaná adenovirem nebo adeno-spojeným virovým vektorem. [35]

### **Léčba zaměřená na $\tau$ -protein**

Enzymy zapojené do etiopatogeneze  $\tau$ -proteinu, lze využít u terapie AD, jedná se o inhibitory kinasy fosforylasy  $\tau$ -proteinu a sloučeniny, které zabraňují agregaci  $\tau$ -proteinu nebo podporují rozpad agregátů.[35]

Léčba zaměřená na  $\tau$ -protein je zatím pouze na úrovni výzkumu, ale zdá se slibná. Studie na zvířatech potvrdily, že v počátečních patologických změnách  $\tau$ -proteinu, lithná sůl, což je druh nesespecifického GSK3 inhibitoru, dokáže zabránit nadměrné fosforylaci  $\tau$ -proteinu a zabránit dalšímu progresu nemoci. Bohužel má lithná sůl jen velmi malý efekt u pozdní fáze onemocnění.[35]

Uvažuje se, že dalším slibným léčivem by mohla být methylenová modř, protože u testů na zvířatech prokázala, že dokáže nejen zabránit polymerizaci  $\tau$ -proteinu v oligomery, ale také redukuje hladinu A $\beta$  v mozku. K tomu má i antioxidační vlastnosti a samostatně nebo v kombinaci s rivastigminem pomáhá při deficitech s učením. [35]

Primární funkcí  $\tau$ -proteinu je stabilizace konformace mikrotubulů (conformation of microtubules, MT's). Jednou z látek stabilizujících MT je antineoplastikum, paklitaxel. Paklitaxel se váže do lumen MT na  $\beta$ -tubulinové podjednotce a podporuje stabilizaci MT, namísto  $\tau$ -proteinu. Podobnou funkci má i epothilon. *In vitro*, působí paklitaxel i epothilon proti neurotoxicitě, způsobené  $\tau$ -proteinem nebo A $\beta$ . Bohužel paklitaxel neprochází

hematoencefalickou membránou, zatímco epothilon ano. Tato látka je zatím, ale pouze ve fázi 1b klinického vývoje. [35]

### **Doplňková terapie**

Pro maximální dosažení cílů, zkvalitnění a prodloužení života nemocného s AD je důležité zaměřit se na komplexní péči. Je nutné léčit faktory, které nemoc zhoršují: přidružené metabolické poruchy, infekce, hypertenze, sensorické poruchy, malnutrice, jelikož demence zvyšuje nutriční potřebu, doporučuje se tedy denní příjem  $35 \text{ kcal} \cdot \text{kg}^{-1}$ , doplněný o vitaminy skupiny B, kyselinu listovou a selen.[2]

Musí se dát pozor, aby pacienti neužívali léky s anticholinergním účinkem a omezit užívání psychofarmak.[2]

Pro léčbu deprese u pacientů s AD se používají léčiva ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Antipsychotika jsou efektivní v léčbě symptomů jako je psychóza, agrese a agitace, používají se, ale pouze příležitostně a v malých dávkách, kvůli jejich nežádoucím účinkům.[2, 41]

Mezi nefarmakologické opatření je důležité zařadit pravidelnost denního režimu, omezit, co nejvíce změny (stejně prostředí, stejný pečovatel). Denní rutina totiž napomáhá udržet funkční schopnosti pacienta. Udržovat pacienta v pravidelně fyzicky aktivního, procházky, tanec atd. Dodržovat zásady pro bezpečné vybavení bytu, využít i signalizační pomůcky či kompenzační pomůcky. [2]

## 4. Experimentální část

### 4.1 Použitý materiál a vybavení

#### 4.1.1 Chemikálie

- Acetylcholin jodid p.a. (Sigma Aldrich, Praha) (ETChI)
- Amoniak vodný roztok 25 – 29% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH<sub>4</sub>OH)
- Butyrylcholinesterasa z koňského séra – lyofilizát, ≥ 900 jednotek·mg<sup>-1</sup> proteinu (Sigma Aldrich, Praha)
- Diethylamin p.a. (ing. Švec – Penta, Praha) (Et<sub>2</sub>NH)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥98% (sigma Aldrich, Praha) (DNTB)
- Dusičnan bismutitý zásaditý č. (Lachema, Brno) (Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)
- Chlorid rtuťnatý p.a. (Fisher scientific, Pardubice) (HgCl<sub>2</sub>)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina trifluoroctová >99,5% (Fluka – Bukurešť, Rumunsko) (TFAA)
- Kyselina vinná p.a. (Balex, Pardubice)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

#### 4.1.2 Rozpouštědla

- Aceton p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha)
- Acetonitril (Ing. Kroupa – Balex, Pardubice – Rosice) (CH<sub>3</sub>CN)
- Benzin lékařský RN vyhovující ČL 2009 a ČSN 65 6544 (Ing. Švec – Penta, Praha) (benzin)
- Chloroform (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl<sub>3</sub>)
- Chloroform deuterovaný pro NMR analýzu chloroform-*d* 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl<sub>3</sub>)
- Cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>)
- Diethylamin p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et<sub>2</sub>NH)
- Diethylether p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et<sub>2</sub>O)
- Dichlormethan p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)
- Ethanol 95% (Lihohrudim, Chrudim) (EtOH)

- Ethylester kyseliny octové – ethyl acetát p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- Methanol p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- Methanol deuterovaný pro NMR analýzu methanol-*d*4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD<sub>3</sub>OD)
- Methanol HPLC gradient (J. T. Baker, Deventer, Netherlands) (MeOH)
- Toluén č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>)
- Voda superčistá

#### 4.1.3 Pufry

- 100mM Fosfátový pufr pH 7,4. Pufr byl připraven smícháním roztoků NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 31,2 g·l<sup>-1</sup> a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 28,4 g·l<sup>-1</sup> s vodou, objemově v poměru 9,5 : 40,5 : 50.
- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4. Pufr byl připraven smícháním roztoků NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 1,56 g·l<sup>-1</sup> a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,42 g·l<sup>-1</sup> s vodou, objemově v poměru 9,5 : 10,5 : 50.
- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150mM NaCl. Při přípravě bylo rozpuštěno 8,766 g NaCl v 5mM fosfátovém pufru 7,4 do objemu 1000 ml.
- PBS: 100mM Na/K fosfátový pufr 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl. Pufr byl připraven smícháním 20 ml roztoku A se 100 ml roztoku B. Roztok A: 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1,5 g NaCl bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Roztok B: 0,89 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O a 1,5 g NaCl bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.

#### 4.1.4 Vybíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

- **S1** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> : Et<sub>2</sub>NH ( 95:5)
- **S2** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>:Et<sub>2</sub>NH (90:10)
- **S3** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> :EtOAc:Et<sub>2</sub>NH (50:40:10)
- **S4** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>: EtOAc:Et<sub>2</sub>NH (15:75:10)
- **S5** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>:EtOAc:Et<sub>2</sub>NH (50:40:10)
- **S6** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>:EtOAc:Et<sub>2</sub>NH (5:4:1)
- **S7** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>:C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O:NH<sub>3</sub> (30:60:10)
- **S8** EtOAc:MeOH:TFAA (40:10:0,1)
- **S9** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>:EtOAc:Et<sub>2</sub>NH (50:45:5)

#### 4.1.5 Chromatografické adsorbenty

##### Adsorbent pro sloupcovou chromatografii

- Na sloupcovou chromatografii byl použit oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), deaktivovaný 6 % vody.

##### Adsorbent pro tenkovrstvou chromatografii

- Komerční desky TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck, 20 cm × 10 cm, hliníková deska, tloušťka vrstvy silikagelu 0,2 mm.
- Lité skleněné desky pro preparativní chromatografii 15 × 15 cm (Kiesegel 60 GF<sub>254</sub>).

#### 4.1.6 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha)
- Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)
- Síran sodný bezvodý (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- Vata
- Vliselin

#### 4.1.7 Detekční činidla

##### Mayerovo činidlo

Činidlo se připravuje rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g  $\text{HgCl}_2$  v prášku, čímž vznikla sraženina, která byla míchána, dokud roztok nebyl čirý a bezbarvý nebo světle žluté barvy. Činidlo bylo skladováno v chladu při 4 °C.

##### Dragendorffovo činidlo

Byl použit zásobní roztok činidla, který byl připraven smísením 1,7 g zásaditého  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  a 20,0 g kyseliny vinné v 80,0 ml vody s roztokem 16,0 g KI ve 40,0 ml vody v poměru 1:1. Zásobní roztok byl skladován v chladu ve tmavé skleněné nádobě. Vlastní detekční roztok pro analýzu vzorků se připravil smísením 5,0 ml zásobního roztoku s roztokem 10,0 g kyseliny vinné v 50,0 ml vody. 29

#### 4.1.8 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

- Příprava roztoku 5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) probíhala rozpuštěním látky v 100mM fosfátovém pufru pH 7,4. Připravený roztok byl slabě žlutě zbarvený. Roztok byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C maximálně 1. týden.
- Roztok ATChI (10mM) byl připraven tak, že látka byla rozpuštěna ve vodě a vznikl čirý roztok, který byl uchováván v lednici při 4 °C, maximálně 1 týden.
- Roztok BTChI (10mM) byl připraven obdobným způsobem a stejným způsobem i uchováván jako roztok ATChI.

#### 4.1.9 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP

- Byl použit roztok 10mM Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu, který byl připraven rozpuštěním látky v 40% 4,4-dioxanu a následně byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

#### 4.1.10 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 (Radiometr, Copenhagen, Denmark)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec 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 0,25 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 Laborta 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany)

## **4.2 Obecné postupy**

### **4.2.1 Příprava rozpouštědel**

Veškerá použitá rozpouštědla byla přečištěna destilací a uchovávána v tmavých lahvích pro ochranu před světlem.

### **4.2.2 Odpařování, sušení a skladování extraktů**

Rozpouštědla, z jednotlivých alkaloidních frakcí a extraktů získaných ze sloupcové a tenkovrstvé chromatografie, byla odpařována na vakuové odparce na vodní lázni při teplotě 40 °C a sníženém tlaku cca 1,33 kPa.

Získané extrakty, jednotlivé alkaloidní frakce i chemicky čisté látky byly sušeny nejméně 24 hodin ve vakuovém exsikátoru nad silikagelovými perlami. Vysušené látky byly skladovány v lednici při teplotě 2–8 °C.



### **4.2.3 Chromatografické metody**

Izolace jednotlivých frakcí a následné izolace jednotlivých alkaloidů probíhalo na sloupcové a tenkovrstvé chromatografii.

#### **4.2.3.1 Sloupcová chromatografie**

Sloupcová chromatografie probíhala způsobem stupňovité eluce za podtlaku s použitím vodní vývěvy. Jako suspenze absorbentu byl použit neutrální  $\text{Al}_2\text{O}_3$  deaktivovaný 6 % vody. Suspenze absorbentu byla nalita do skleněné kolony spolu s rozpouštědly, které byly použity zároveň jako zahajovací eluční soustava, tím byl benzín s EtOAc, dále pouze EtOAc, následovala směs EtOAc s MeOH a nakonec pouze MeOH. Na sloupec čistého adsorbentu byl nanesen  $\text{Al}_2\text{O}_3$  s adsorbovaným triturovaným alkaloidním extraktem. Jednotlivé frakce byly jímány po 250 ml.

#### **4.2.3.2 Příprava litých desek pro tenkovrstvou chromatografii**

Pro TLC byly použity skleněné desky o rozměru 15 x 15 cm. Desky byly nejdříve očištěny chloroformem od případných organických nečistot. Po očištění byla na desky rovnoměrně rozprostřena suspenze silikagelu ve vodě. Suspenze potřebná na jednu desku obsahovala 6,5 g silikagelu a 22,4 ml vody. Zhotovené desky se suspenzí silikagelu byly následně sušeny při pokojové teplotě po dobu minimálně 24 hodin.

#### **4.2.3.3 Tenkovrstvá chromatografie**

TLC chromatografie byla prováděna ve skleněných komorách předem nasycených parami mobilní fáze. Doba sycení komor byla minimálně 20 minut. Vzorek alkaloidního extraktu byl rozpuštěn v malém množství  $\text{CHCl}_3$  a nanesen na skleněné nebo komerčně vyráběné hliníkové desky v jedné linii, která končila 1 cm od krajů desky. Nanesení směsi probíhalo tak, aby množství nepřesahovalo  $3 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-1}$  (laboratorně připravovaných desek) nebo  $1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-1}$  (u komerčně vyráběných desek). Nanesený vzorek byl sušen až do odpaření rozpouštědla a následně byly desky vloženy do komor s mobilní fází, kde byly vyvíjeny, jednou, popřípadě opakovaně, ve stejné mobilní fázi nebo také i jiné mobilní fázi. Po vyvinutí byly desky usušeny a následně byla prováděna detekce alkaloidů pod UV lampou při vlnové délce 254 a 366 nm. Pro potvrzení přítomnosti alkaloidů bylo použito Dragendorffovo činidlo a v případě přítomnosti alkaloidů vzniklo hnědo-oranžové zbarvení. Při preparativní TLC byly jednotlivé zóny obsahující alkaloidy vyznačeny preparativní jehlou a jednotlivě vyškrabány z desky. K silikagelu jednotlivých zón bylo přidáno přibližně stejné objemové množství křemeliny, směs

byla následně vložena do chromatografické trubice, kde byla eluována cca 20 násobným množstvím směsi EtOAc a MeOH v poměru 1:1, do doby než sloupec neobsahoval žádný alkaloid.

#### **4.2.3.4 Detekce alkaloidů**

Při přípravě alkaloidního extraktu vytřepáváním z vodné fáze bylo využito Mayerovo činidlo pro kontrolu přítomnosti alkaloidů.

K roztoku vzorku bylo přidáno 1–2 ml vody, byl okyselen se několika kapkami 2 % HCl na pH 2–3 a přidáno pár kapek činidla. V přítomnosti alkaloidů došlo k vyloučení bělavé sraženiny z roztoku.

Při detekci alkaloidů u chromatogramů probíhala detekce nejprve vizuálně UV zářením při vlnové délce  $\lambda = 254$  a  $\lambda = 366$  nm. Označené zóny na chromatogramech byly následně detekovány postřikem Dragendorffovým činidlem. V přítomnosti alkaloidů vznikly oranžovo-hnědé skvrny.

## 4.3 Strukturní analýza

### 4.3.1 Hmotností analýza

#### Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI)

Měření MS (ESI) spektra probíhalo na spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizací elektrosprejem v kladném módu a iontovou pastí jako analyzátozem. MS<sup>n</sup> bylo prováděno při kolizní energii 40 eV., přičemž alkaloidy byly rozpuštěny v MeOH (1 mg·ml<sup>-1</sup>) a zavedeny byly přímou sondou.

#### Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací (EI)

MS (EI) spektra byla naměřena na spektrometru Agilent 7890A GC 5975 v módu 70 eV na GC koloně DP-5 MS. Alkaloidy byly rozpuštěny v MeOH (1 mg·ml<sup>-1</sup>) a nástřik roztoku byl proveden ve split módu. Detekce alkaloidů byla provedena na základě porovnání spekter s NIST knihovnou a referenčními spektry alkaloidů, které již byly izolovány a identifikovány v rámci skupiny ADINACO (Alzheimer's Disease and NATural COmpounds).

### 4.3.2 NMR analýza

NMR analýza probíhala při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S5 při frekvenci 499,87 MHz pro jádra <sup>1</sup>H a 125,70 MHz pro jádra <sup>13</sup>C. Na ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda OneNMR s regulací teploty. Chemické posuny byly zaznamenávány jako hodnoty chemického posunu ( $\delta$ ) pars per milion (ppm) a byly nepřímě vztaženy na hodnoty vnitřního standardu (TMS). Spektra byla měřena ve dvou různých prostředích, v roztocích CDCl<sub>3</sub>, případně CD<sub>3</sub>OD. V prostředí CDCl<sub>3</sub> byly hodnoty chemického posunu pro atomy <sup>1</sup>H  $\delta$  = 7,26 ppm a pro atomy <sup>13</sup>C  $\delta$  = 49,0 ppm. U CD<sub>3</sub>OD u atomů <sup>1</sup>H  $\delta$  = 3,30 ppm a u atomů <sup>13</sup>C  $\delta$  = 49,0 ppm. Data, která byla měřením získána, jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita <sup>1</sup>H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a interakční konstanta (v Hz).

### 4.3.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost se naměřovala v roztocích alkaloidů v  $\text{CHCl}_3$  nebo v MeOH na polarimetru P3000 a specifická otáčivost byla dopočtena dle vzorce:

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

t – teplota měření

D – sodíková D čára = 589,3 nm

$\alpha$  – naměřená otáčivost [°]

c – koncentrace naměřeného alkaloidu [g. 100 ml<sup>-1</sup>]

l – délka kyvety [dm]

## 4.4 Stanovení biologické aktivity

Stanovení biologické aktivity izolovaných látek nebylo součástí této diplomové práce. Měření inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Inhibiční aktivitu vůči prolyloligopeptidase stanovily Mgr. Martina Hrabínová a doc. PharmDr. Daniel Juna, Ph.D.

### 4.4.1 Příprava hemolyzátu a plazmy

Jako zdroj lidských cholinesteras byla použita krev zdravého dobrovolníka. Zdrojem BuChE byla plazma zbavená erytrocytů a hemolyzát erytrocytů byl použit jako zdroj AChE. K čerstvě odebrané krvi bylo přidáno 2 ml 3,4 % citrátu sodného (w/v) na 18 ml krve. Centrifugací při 4 °C a rychlosti 4000 ot·min<sup>-1</sup> byla z krve oddělena plazma, použita byla centrifuga Boeco U-32R, a následně byla odsáta, tak aby v ní nebyly přítomny erytrocyty, a uchována jako zdroj BuChE.

Erytrocyty byly promyty celkem třikrát 5mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 obsahujícím 150mM NaCl (ca 100 ml) a opět byly stejným způsobem centrifugovány. K promytným erytrocytům byl přidán 5mM fosfátový pufr o pH 7,4 (1:9; v/v) a za stálého míchání po dobu deseti minut došlo k jejich lýze.

Ihned po přípravě byla stanovena absorbance BuChE v plazmě a AChE v hemolyzátu, popřípadě byly dále ředěny příslušným množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4. Veškeré enzymové preparáty se uchovávaly při teplotě -22 °C.

#### 4.4.2 Stanovení absorbance enzymových preparátů a stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči lidským cholinesterasám

Pro stanovení inhibiční aktivity ( $IC_{50}$ ) vůči cholinesterasám byla použita modifikovaná Ellmannova metoda.

Naneseno bylo 8,3  $\mu$ l roztoku enzymového preparátu do jamky mikrotitrační destičky vždy o určité koncentraci (objemový poměr 1:0, 3:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 a 1:5 hemolyzátu v 5 mM fosfátovém pufru pH 7,4; 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 plazmy v 5 mM fosfátovém pufru pH 7,4), 283  $\mu$ l 5 mM roztoku DTNB ve fosfátovém pufru pH 7,4 a 8,3  $\mu$ l testovaného alkaloidu o určité koncentraci v DMSO (40mM, 10mM, 4mM, 1mM, 0,4mM a 0mM). Směs byla 1 min třepána na mikrotřepačce, po protřepání byla vložena do readru SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader, kde byla inkubována 5 min při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo k vzorkům přidáno 33,3  $\mu$ l DMSO, což je slepý vzorek při stanovení absorbance enzymových preparátů nebo 33,3  $\mu$ l enzymového preparátu a po 2 min byla změřena absorbance. Pokud 0,4mM koncentrace alkaloidu prokazuje více než 3% inhibici, znamená to, že je látka silným inhibitorem cholinesterasy a je nutné změřit další koncentrační řadu (0,1mM, 0,04mM, 0,01mM, 0,004mM, 0,001mM a čistý DMSO). Pro každou koncentraci enzymového vzorku byla absorbance stanovena šestkrát při 37 °C, přičemž absorbance stanovení inhibiční aktivity AChE byla naměřena při  $\lambda = 436$  nm, BuChE při  $\lambda = 412$  nm. 50% Inhibiční aktivita byla dopočítána s pomocí programu GraphPad Prism dle vzorce:

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

% I – procento inhibice

$\Delta A_{Bl}$  – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min

$\Delta A_{Sa}$  – absorbance testovaného vzorku během 1 min

Zjištěná  $IC_{50}$  pro AChE a BuChE pro každou látku byla porovnávána s  $IC_{50}$  referenčních látek.

#### 4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči prolyloligopeptidase

Enzym prolyloligopeptidasa (POP), jehož specifická aktivita činí  $0,2 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ , byla rozpuštěna v pufovaném fyziologickém roztoku PBS. Test byl prováděn na standardní polystyrenové mikrotitrační destičce s 96 jamkami a s rovným průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v DMSO (10mM). Testovací roztoky ( $10^{-3} - 10^{-7} \text{ M}$ ) byly připraveny naředěním superčistou vodou. Slepé vzorky byly připraveny se stejnou koncentrací DMSO. Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10mM) a byl použit jako substrát pro POP. Bylo smícháno 170  $\mu\text{l}$  PBS, 5  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky o určité koncentraci a 5  $\mu\text{l}$  roztoku POP do jamky mikrotitrační destičky a následně byly inkubovány 5 minut při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Sledován byl vznik *p*-nitroanilidu, který je přímo úměrný POP aktivitě a byl měřen spektrofotometricky při  $\lambda = 405 \text{ nm}$  na microplate ELISA readeru EL800.  $\text{IC}_{50}$  Jednotlivých testovaných látek byla porovnávána s  $\text{IC}_{50}$  referenčních látek.

### 4.5 Izolace alkaloidů

#### 4.5.1 Příprava alkaloidního extraktu

Příprava alkaloidního extraktu z drogy nebyla součástí této diplomové práce. Na přípravě extraktu pracoval prof. RNDr. Lubomír Opletal.

Alkaloidní extrakt byl připraven z 44 kg rozemletých větví *Liriodendron tulipifera* L., které byly dodány z Lindava 2010–2013, sběr drogy probíhal v letech 2007–2008 a velikost nařezané drogy byla do 5 mm. Droga byla 2x extrahována za varu 95 % etanolem vždy s pětinasobným objemovým množstvím rozpouštědla. Jednotlivé extrakty byly spojeny, zfiltrvány a odpařeny za nízkého tlaku až do řídkého roztoku. Následně byla teplota zvýšena na  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , byl přidán 1 l vody a oddestilován zbytek EtOH. Suspenze byla za tepla zředěna 7 l 2 % HCl a 2 l vody (pH cca 1–2). Po zchlazení extraktu byl zfiltrován přes vliselin.

Po zfiltrování zbylo 12 l hnědého zkaleného filtrátu, který byl následně přefiltrován přes vrstvu křemeliny. Vzniklý čirý hnědý filtrát byl zalkalizován 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  na pH 9–10 a šedozelený kalný roztok byl vytřepán čtyřikrát 3 l  $\text{CHCl}_3$ . Chloroformová fáze byla následně odpařena, až vzniklo 32,9 g velmi viskózního tmavě hnědočerveného odparku.

Nakonec bylo provedeno TLC sumárního chloroformového výtřepku v nasycené komoře s mobilní fází S1. Vyvíjení desky probíhalo dvakrát, detekce alkaloidů byla stanovena při UV 254 nm a následně i Dragendorffovým činidlem.



Obrázek 8. Sumární alkaloidní chloroformový výtřepok *Liriodendron tulipifera* L.

#### 4.5.1.1 Čištění chloroformového výtřepku (LT-d/ChCl<sub>3</sub>-A)

101,6 g velmi viskózního hnědočerveného odparku bylo rozeřáno na 70 °C a přidalo se 250 ml 2 % HCl. Směs byla důkladně protřepána a sonikována při 60 °C, při stupni sonikace 10 za dobu 10 minut. Následně byl načervenalý roztok přefiltrován přes vliselin, zbytek roztoku byl v baňce promyt horkou vodou a roztok byl doplněn na 1350 ml (pH 1). Po zchlazení byl roztok zalkalizován 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9–10, čímž byla vyloučena intenzivně šedavá sraženina, a následně byl třikrát výtřepán 450 ml CHCl<sub>3</sub>. Nakonec byla chloroformová fáze odpařena. Výsledná hmotnost tmavě hnědého velmi viskózního odparku byla 18,2 g.

#### 4.5.1.2 Čištění předčištěného etherového výtřepku (LT-d/Et<sub>2</sub>O-A)

Tmavě hnědý velmi viskózní odparek o hmotnosti 18,2 g byl rozpuštěn ve 200 ml 2 % HCl a poté sonikován 10 minut při stupni sonikace 10. Roztok byl přefiltrován přes vliselin a zbytek v baňce byl zahřát na 70 °C s 25 ml vody, poté bylo přidáno 25 ml 2 % HCl a roztok byl sonikován 10 minut při 60 °C. Roztok byl zředěn a přefiltrován k prvnímu podílu roztoku chloridů alkaloidů. Spojený roztok byl zředěn vodou a doplněn do 900 ml a poté zfiltrován přes tenkou vrstvu křemeliny. Vzniklý kyselý roztok byl zbaven nečistot, tím že byl třikrát výtřepán 250 ml Et<sub>2</sub>O. Tím vzniklo 2,53 g velmi viskózního žlutého olejovitého odparku, který byl z další práce vyloučen.

Kyselý roztok byl alkalizován 10 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  až na pH 9–10, čímž byla vyloučena práškovitá hmota ve formě bělavého sedimentu. Tato suspenze byla vytřepána čtyřikrát 300 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ . Po odpaření vzniklo 3,60 g velmi viskózního žlutého pevného odparku. Následovala detekce Mayerovým činidlem, která prokázala, že se v roztoku vyskytuje stále velké množství alkaloidů a proto bylo provedeno další vytřepání a to třikrát s použitím 250 ml  $\text{CHCl}_3$ . Byl odpařen  $\text{CHCl}_3$  a vzniklý odparek měl hmotnost 3,65 g, byl velmi viskózní, pevný, s hnědo-zeleným zbarvením.

Pro TLC byla použita nasycená komora s vyvíjecí směsí S2. Deska byla vyvíjena pouze jednou. Detekce probíhala pod UV lampou při 254 nm a následně i Dragendorffovým činidlem.

D1 –  $\text{Et}_2\text{O}$  výtřepek z kyselého roztoku (pH 1)

D9 –  $\text{Et}_2\text{O}$  výtřepek z bazického roztoku (pH 9)

D9 (poslední v řadě) –  $\text{CHCl}_3$  výtřepek z bazického roztoku (pH 9–10)



Obrázek 9. Přečištěné alkaloidní chloroformové a etherové výtřepky

Oba alkaloidní výtřepky ze dřeva *Liriodendron tulipifera* L. byly spojeny, hmotnost byla 7.25g.

#### 4.5.2 Sloupcová chromatografie extraktu

Spojené alkaloidní výtřepky byly podrobeny sloupcové chromatografii za podtlaku použitím vodní vývěvy. Jako adsorbent byl použit 225 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  deaktivovaný 6 % vody. Průměr kolony byl

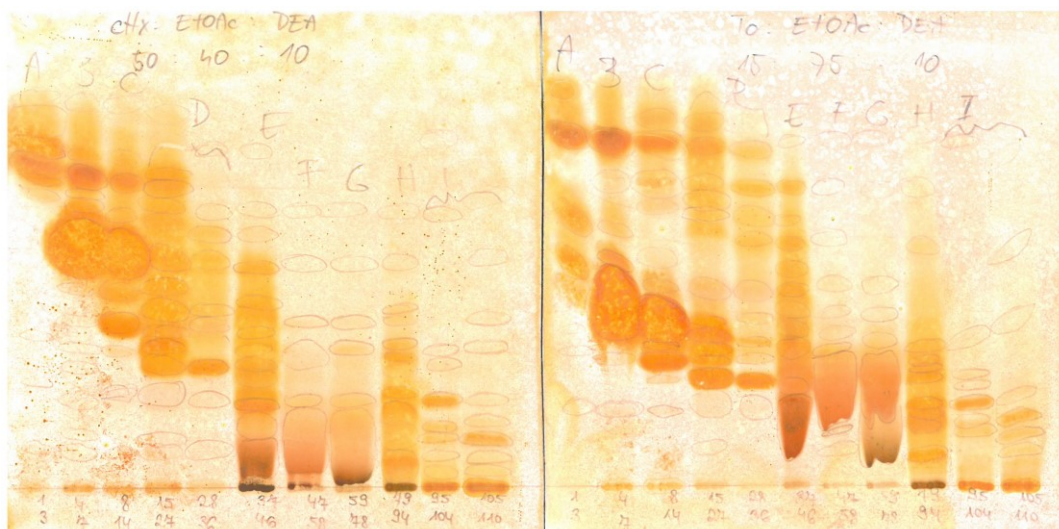


4,3 cm a výška adsorbentu 16 cm. Na přípravu trituratione alkaloidního extraktu bylo použito 28 g téhož adsorbentu. Alkaloidní extrakt byl rozpuštěn v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, poté byl do roztoku přidán adsorbent a vzniklá suspenze byla při míchání odpařena na vodní lázni do sucha. Dosušení trituratione proběhlo v exsikatoru (24 hodin). Výška trituratione ve sloupci dosahovala 2,1 cm.

Eluce probíhala stupňovitě a to směsí benzínu s EtOAc (80:20, 70:30, 50:50), dále EtOAc s MeOH (98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 50:50) a nakonec pouze MeOH. Jednotlivé frakce byly jímány po 250 ml. Pomocí TLC (vyvíjecí směsi S3, S4, S5) s následným postříkem Dragendorffovým činidlem byly jednotlivé frakce pospojovány do 9 souhrnných frakcí A–I (viz tabulka 3).

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

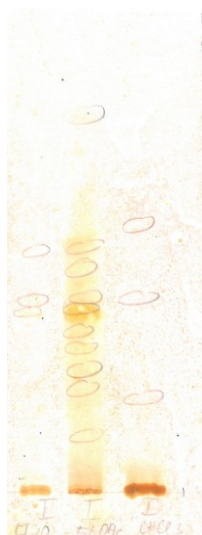
Tabulka 3. Frakce získané sloupcovou chromatografií



Obrázek 10. TLC chromatogramy frakcí

### 4.5.3 Zpracování frakce

Pro tuto diplomovou práci byla zpracována frakce označená I (95-110). Odparek z frakce I o hmotnosti 1,9454 g byl rozpuštěn v 10 ml 5% HCl za pomoci sonifikace a zvýšené teploty. Tím přešly alkaloidy do formy rozpustných chloridů a následně byl rozpuštěný vzorek zředěn, přefiltrován přes křemelinu, křemelina promyta vodou. Následně bylo provedeno odtučnění pomocí Et<sub>2</sub>O (dvakrát 50 ml). Kyselý roztok byl neutralizován 25 ml 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Alkaloidy byly po neutralizaci 10x vytřepány 100 ml do ethylacetátu. Následně byl spojený alkaloidní roztok sušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Suspenze s alkaloidy byla zfiltrována a filtrát byl odpařen (736,1 mg).



Obrázek 11. TLC chromatogram frakce I po vytřepávání

Vzorek o hmotnosti 736,1 mg byl rozpuštěn ve směsi EtOAc s MeOH (1:1). Rozpuštěný vzorek byl nanesen na 20 skleněných desek o velikosti 15 x 15 cm. Pro preparativní TLC byla

vybrána vyvíjecí soustava S6. Desky byly v předem nasycených komorách vyvíjeny jednou. Bylo separováno osm podfrakcí (I1-I8).

Podfrakce I3 o hmotnosti 21,6mg byla nanášena na dvě komerční desky o rozměru 20 x 15 cm a byla vyvíjena ve vyvíjecí směsi S6 jednou. Byla separována jedna zóna, čímž byla získána látka LTD01, která vážila 6,5 mg.

Podfrakce I7 o hmotnosti 112,8 mg byla nanášena na šest komerčních vyvíjecích desek o velikosti 20 x 10 cm. Jako vyvíjecí fáze byla použita S7 a desky byly vyvíjeny dvakrát. Byly separovány čtyři zóny I7a, I7b, I7c, I7d.

Dále byla zpracována zóna I7a;  $m=2,8$  mg. Rozpuštěná zóna byla nanášena na jednu komerční desku o velikosti 20 x 10 cm a byla vyvíjena ve směsi S6 jednou. Výsledná hmotnost získané látky LTD02 byla 2,8 mg.

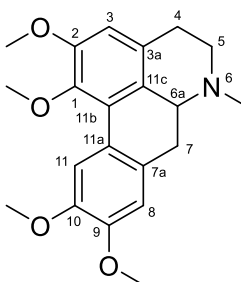
Zóna I7b o hmotnosti 31,2 mg byla nanášena na dvě komerční desky (20 x 10 cm) a byla vyvíjena v komoře nasycené vyvíjecí soustavou S8. Desky byly vysušeny a znovu vyvíjeny, tentokrát dvakrát ve směsi S9. Výsledná hmotnost získané látky LTD03 byla 31,2 mg.

## 5. Výsledky

### 5.1 Strukturní analýza alkaloidů získaných z *Liriodendron tulipifera* L. a jejich fyzikálně-chemická charakteristika

#### 5.1.1 LTD01: (+)-Glaucin

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>



Obrázek 12. (+)-Glaucin

##### 5.1.1.1 MS analýza

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 355 (M<sup>+</sup>, 78), 354 (100), 340 (53), 324 (27), 308 (15), 297 (15), 281 (24), 266 (6).

##### 5.1.1.2 NMR analýza

**<sup>1</sup>H NMR** (500MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.97 (1H, s), 6.88 (1H, s), 6.68 (1H, s), 3.85 (3H, s), 3.83 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-2.93 (4H, m), 2.67 (1H, dd,  $J$  = 16.1, 3.4 Hz), 2.52 (3H, s), 2.50-2.42 (2H, m).

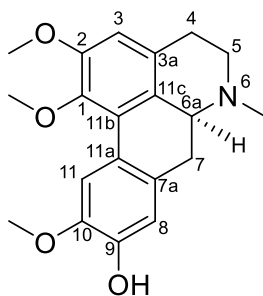
**<sup>13</sup>C NMR** (500MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 153.7, 149.8, 149.0, 145.7, 130.7, 129.9, 127.9, 127.7, 125.7, 113.5, 112.6, 112.0, 63.8, 60.5, 56.5, 56.4, 56.0, 54.2, 43.9, 34.9, 29.6.

##### 5.1.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{27} = +127,4^\circ$  (c=0,13; MeOH)

### 5.1.2 LTD02: (+)-*N*-methyllaurotetanin

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>



Obrázek 13. (+)-*N*-methyllaurotetanin

#### 5.1.2.1 MS analýza

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 340(M<sup>+</sup>, 100), 326 (42), 310 (21), 298 (15), 283 (17), 267 (22), 252 (6), 238(5), 154 (9).

#### 5.1.2.2 NMR analýza

**<sup>1</sup>H NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,05 (1H, s, H11), 6,81 (1H, s, H8), 6,58 (1H, s, H3), 3,89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,65 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,27-2,90 (4H, m, H4, H5, H6a, H7), 2,73-2,46 (3H, m, H4, H5, H7), 2,54 (3H, s overlapped, NCH<sub>3</sub>).

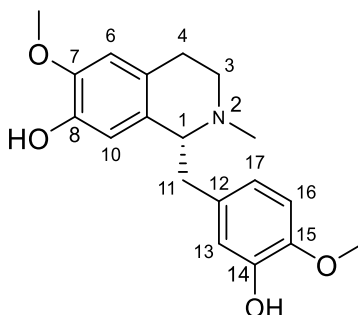
**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  151,9, 145,3, 144,8, 144,2, 130,0, 128,8, 127,0, 127,0, 123,9, 113,9, 111,2, 110,2, 62,5, 60,1, 56,0, 55,8, 53,3, 43,9, 34,2, 29,1.

#### 5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +104,1$  (c=0,1076; CHCl<sub>3</sub>).

### 5.1.3 LTD03: (+)-Retikulin

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>



Obrázek 14. (+)-Retikulin

#### 5.1.3.1 MS analýza

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 192 (M<sup>+</sup>, 100), 177 (20), 148 (6).

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = [M+H]<sup>+</sup>330 (100), 300 (5), 192 (6).

#### 5.1.3.2 NMR analýza

**<sup>1</sup>H NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3,66-3,69 (1H, t, H1), 2,99-3,04 (2H, m, H $\alpha$ ), 2,74-2,79 (2H, m, H3), 2,55-2,60 (2H, m, H4), 6,51 (1H, s, H5), 6,32 (1H, s, H8), 6,73 (1H, d,  $J$  = 1,72, H2'), 6,69 (1H, d,  $J$  = 8,32, H5'), 6,54 (1H, dd,  $J_1$  = 8,28,  $J_2$  = 1,96, H6'), 3,81 (3H, s, OMe6), 3,81 (3H, s, OMe4'), 2,44 (3H, s, N-Me).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  64,45 (C1), 40,85 (C $\alpha$ ), 46,48 (C3), 24,65 (C4), 128,75 (C4a), 110,54 (C5), 145,31 (C6), 143,31 (C7), 113,70 (C8), 124,71 (C8a), 132,72 (C1'), 115,61 (C2'), 145,05 (C3'), 145,26 (C4'), 110,43 (C5'), 120,90 (C6'), 55,84 (OMe6), 55,79 (OMe4'), 42,12 (N-Me).

#### 5.1.3.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{27} = +127,4$  (c=0,0113; MeOH).

## 5.2 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči AChE, BuChE a POP

Alkaloid	IC <sub>50</sub> [μM]		
	AChE	BuChE	POP
(+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin	898,03 ± 10,52	>1000	135,4 ± 23,2
(+)-Retikulin	509,05 ± 44,25	33,61 ± 3,04	392,3 ± 184,3
(+)-Glaucin	>1000	>1000	1783 ± 50
Standardy			
Berberin	0,705 ± 0,104	30,72 ± 3,49	142,3 ± 21,1
(-)-Galanthamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30	>1000
(-)-Huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000	>1000
Z-Pro-prolinal	-	-	3,269 ± 0,02 · 10 <sup>-3</sup>

Tabulka 4. Biologická aktivita izolovaných alkaloidů

## 6. Diskuze

Pro tuto diplomovou práci bylo zpracováno dřevo rostliny *Liriodendron tulipifera* L. Sloupcovou chromatografií bylo z rostlinného extraktu získáno devět frakcí (A až I), přičemž dále byla v práci zpracovávána pouze s frakcí I. Čištěním frakce pomocí TLC byly získány celkem tři alkaloidy, z toho dva aporfinové alkaloidy (+)-*N*-methyllaurotetain a (+)-glaucin, které byly již dříve z *L. tulipifera* izolovány. Benzylisochinolinový alkaloid (+)-retikulin byl izolován z *L. tulipifera* poprvé.

Aporfinové alkaloidy, kam jsou řazeny (+)-*N*-methyllaurotetain a (+)-glaucin, jsou jedním z velmi častých podtypů isochinolinových alkaloidů. Lze je najít u několika rostlinných řádů, jako je Annonales, Laurales, Berberidales, Papaverales a Ranunculales.[42]

(+)-Retikulin je meziproduktem při biosyntéze řady isochinolinových alkaloidů (protoberberinového, aporfinového, benzofenantridinového a morfinanového typu) tudíž jeho výskyt je velmi pravděpodobný v řadě alkaloidních drog alespoň v malém stopovém množství.[43] Jedná se o prekurzor morfinu a také parciální agonista  $\mu$ -opiodního receptoru aktivovaného G-proteinem.[44] Tento alkaloid má prokázaný inhibiční účinek na centrální nervový systém,[44] vykazuje také antimikrobní a antifungální vlastnosti.[30, [30, 32] *In vitro* testy ukazují, že (+)-retikulin kompetitivně antagonizuje svalové kontrakce dělohy indukované acetylcholinem a vápníkem.[33] Při testech na potkanech vyvolává vasorelaxaci blokadí  $Ca^{2+}$  kanálů v buňkách L-typu v aortě.[46] Tím pádem by mohl být (+)-retikulin využíván pro svůj kardioprotektivní účinek.[34]

Získané alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám pomocí modifikované spektrofotometrické Ellmanově metodě. Zdrojem AChE byl lyzát lidských erytrocytů a pro BuChE byla zdrojem lidská plazma. Pro vyjádření výsledků byly použity hodnoty  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) a jako porovnávací standardy byly použity huperzin A, berberin a galanthamin.

U (+)-glaucinu byla naměřena nevýznamná inhibice AChE i BuChE, což je rozdíl oproti naměřeným hodnotám z roku 2010, kdy inhibiční aktivita vůči BuChE nebyla měřena a inhibice vůči AChE byla mnohem vyšší. Rozdíl může být způsobem například jiným zdrojem AChE, čímž byla v roce 2010 AChE získána z elektrického úhoře. Alkaloid (+)-retikulin výrazně inhibuje BuChE, ale inhibice AChE nebyla nijak významná, zatímco naměřené inhibiční aktivity vůči



lidským cholinesterasám u (+)-*N*-methyllaurotetaninu prokázaly, že je tento alkaloid zcela neaktivní.

U izolovaných alkaloidů byla také inhibiční aktivita vůči POP, která byla testována spektrofotometrickou metodou. Pro měření byla použita komerční lidská rekombinantní POP. Měření inhibiční aktivity vůči POP se provádí, jelikož je POP přisuzována důležitá role při regulaci peptidových hormonů, které se podílejí na procesech učení a paměti. Ani u jednoho z izolovaných alkaloidů nebyla naměřena významná inhibiční aktivita. Měřením (+)-*N*-methyllaurotetaninu byla zjištěna inhibiční aktivita srovnatelná s inhibiční aktivitou standardu berberinu.[42]

Závěrem lze podotknout, že pro další studie účinků na AD jsou (+)-*N*-methyllaurotetanin, (+)-glaucin neperspektivní, zatímco by se dala věnovat pozornost (+)-retikulinu pro svůj potenciál v inhibici lidských cholinesteras.

## 7. Abstrakt

Klíčová A.: Alkaloidy dřeva druhu *Liriodendron tulipifera* L. a jejich biologická aktivita. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2018.

Školitel: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

**Klíčová slova:** *Liriodendron tulipifera*, sekundární metabolity, alkaloidy, biologická aktivita

Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD) je nejčastější formou demence. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění, které doprovází kognitivní poruchy v kombinaci s afázií, apraxií nebo poruchami výkonných funkcí, které později vedou ke zhoršení pracovních či sociálních schopností. Prozatím neexistuje kauzální léčba tohoto onemocnění a tak probíhá intenzivní výzkum nových látek. Momentálně jsou dostupná léčiva zpomalující postup tohoto onemocnění, mezi ně se řadí i látky přírodního původu.

Při předběžném testování vykázal alkaloidní extrakt ze dřeva *Liriodendron tulipifera* L. inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám, a proto byl vybrán pro izolaci alkaloidů a jejich dalšímu zkoumání.

Izolace probíhala nejdříve pomocí sloupcové chromatografie se stupňovitou elucí. Pro izolaci jednotlivých alkaloidů byla použita preparativní TLC. Následná identifikace alkaloidů probíhala za pomoci strukturních analýz s využitím NMR a MS. Byla naměřena i jejich optická otáčivost. Při měření inhibiční aktivity izolovaných látek vůči acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE) byla použita modifikovaná Ellmanova metoda. Inhibiční aktivita vůči prolyloligopeptidase (POP) byla měřena spektrofotometricky. Získané výsledky byly srovnávány s literaturou.

Izolací byly získány tři čisté alkaloidy: (+)-*N*-methyllaurotetanin, (+)-retikulin a (+)-glaucin. (+)-Retikulin byl získán z *L. tulipifera* poprvé a vykazoval významnou inhibici BuChE, ale nevýznamnou vůči AChE. Inhibiční aktivita (+)-glaucinu a (+)-*N*-methylalurotetaninu nebyla významná. Inhibiční aktivita vůči POP u (+)-*N*-methyllaurotetaninu byla srovnatelná se standardem berberinem.

## 8. Abstract

Klíčová A.: Alkaloids from wood of the species *Liriodendron tulipifera* L. and their biological activity. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department: Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2018.

Supervisor: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

**Key words:** *Liriodendron tulipifera*, secondary metabolites, alkaloids, biological activity

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia. It is neurodegenerative disorder. Patients suffer from cognitive disorder in combination with aphasia, apraxia or disorders of executive functions, which leads to exacerbation of working or social skills. Nowadays, there exist no casual treatment for AD, and that is why the intense research is still waging. Currently there are available remedies, which can slow down progress of AD. These drugs includes also natural substances.

An alkaloid extract of *Liriodendron tulipifera* L. wood showed promising inhibition of human cholinesterases in a preliminary testing. These results were the reason why this extract has been chosen for further isolation of single alkaloids and identification of their biological activity.

Isolation was made by column chromatography with step gradient elution. Then was used preparative TLC to isolate single alkaloids. Identification of alkaloids was accomplished by using structural analyses (NMR and MS). Single alkaloids were measured for their optical rotation. Isolated alkaloids were tested for their inhibition against human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, and for inhibition activity against prolyloligopeptidase (POP), which was measured spectrophotometrically. Results were compared with literature data.

Three alkaloids were isolated: (+)-*N*-methylalurotetanine, (+)-reticuline and (+)-glaucine. (+)-Reticuline was isolated from *L. tulipifera* for the first time and it showed significant inhibition of butyrylcholinesterase, but none of acetylcholinesterase. Neither (+)-glaucine nor (+)-*N*-methylalurotetanin had inhibition activity.

## 9. Literatura

- [1] Petrovska B.B.: Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6/11, 1-5 (2012).
- [2] Vlček J., Fialová D. a kolektiv: *Klinická farmacie I*, Grada Publishing, Praha (2010).
- [3] [www.botani.cz/cs/liriodendron-tulipifera/](http://www.botani.cz/cs/liriodendron-tulipifera/)
- [4] Hejný S., Slavík B.: *Květena České republiky*, díl 1. ACADEMIA, Praha (1997).
- [5] Gutierrez Ozuna R.: Population Genetic Differentiation, Mating System, and Effective Population Size of the Tuliptree (*Liriodendron tulipifera* L.) in the Mid-Atlantic United States. Georgetown University, ProQuest Dissertations Publishing (2017).
- [6] Schühly W., Khan I., Fisher N. H.: The Ethnomedicinal Uses of Magnoliaceae from the Southeastern United States as Leads in Drug Discovery. *Pharmaceutical Biology* 39, 63 (2001).
- [7] Chen-Loung, Chen Hou-Min Chang, Ellis B. Cowling, Chi-Yin Huang Hsu, Gates R. P.: Aporphine alkaloids and lignans formed in response to injury of sapwood in *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry*, Volume: 15, Issue: 7, Pages: 1161-1167 (1976).
- [8] Chien-Chin Chiu, Han-Lin Chou, Pei-Fang Wu, Hsin-Liang Chen, Hui-Min Wang, Chung-Yi Chen: Bio-functional constituents from the stems of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules*, 17(4), 4357-4372 (2012).
- [9] Chien-Hsing Lee, Hsin-Liang Chen, Zi-Ling Hong, Chiao-Wei Hsieh, Sun-Wen Juan, Jin-Cherng Huang, Hui-Min Wang, Chung-Yi Chen: Chemical constituents of *Liriodendron tulipifera*. *Chemistry of natural compounds*, Volume 49, No. 2 (2013).
- [10] Miller Sarah L., Villanueva Heather E., Palazzo Maria C., Wright Brenda S., Setzer William N.: Seasonal variation and bioactivity in the leaf oil of *Liriodendron tulipifera* growing in Huntsville, Alabama. *Natural product communication*, 4/6, 839-843 (2009).
- [11] Eun ju Jeong, Na-Hyun Kim, Jeong-Doo Heo, Ki Yong Lee, Jung-Rae Rho, Young Choong Kim, Sang Hyun Sung: Antifibrotic compounds from *Liriodendron tulipifera* attenuating HSC-T6 proliferation and TNF- $\alpha$  production in RAW264.7 cells. *BIOLOGICAL&PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 38/2, 228-234 (2015).

- [12] 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).
- [13] 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).
- [14] Sriprang S., Khorana N., Ingkaninan K.: Acetylcholinesterase Inhibitor from *Stephania suberosa* Forman. *NU Science Journal* 3, 1 (2006).
- [15] Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A. H. A., Mukhtar M.R., Awang K., Litaudon M., Ata A.: Anti-acetylcholinesterase, anti- $\alpha$ -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia* 83, 298 (2012).
- [16] Tsai S. F., Lee S. S.: Characterization of Acetylcholinesterase Inhibitory Constituents from *Annona glabra* Assisted by HPLC Microfractionation. *J. Nat. Prod.* 73, 1632 (2010).
- [17] Chlebek J., Macáková K., Cáhliková K., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L.: Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* 6, 607 (2011).
- [18] 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.* 7, 1762 (2010).
- [19] Rocky Graziose, Thirumurugan Rathinasabapathya, Carmen Lateganb, Alexandr Pouleva, Peter J. Smith, Mary Gracec, Mary Ann Lilac, Ilya Raskina: Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. Biotech Center, Rutgers, The State university of New Jersey, USA (2011).
- [20] Ya-Fei Kang, Chi-Ming Liu, Chiu-Li Kao, Chung-Yi Chen: Antioxidant and Anticancer Constituents from the leaves of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules*, 19(4), 4234-4245 (2014).
- [21] Yang Yoo Jung, Lee Hak Ju, Choi Don Ha, Huang Hai Shan, Lim Sung Cil, Lee Myung Koo: Effect of scoparone on neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience letters*, Volume: 440, Issue: 1, Pages: 14-18 (2008).

- [22] Cortijo J., Villagrasa V., Pons R., Berto L., Marti-Cabrera M., Martinez-Losa M., Domenech T., Beleta J., Morcillo R. J.: Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: *In vitro* studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *BJP*, Volume: 127, Issue: 7, 1641-1651 (1999).
- [23] Ujváry I.: Psychoactive natural products: overview of recent developments. *Annali dell Istituto Superiore Di Sanita*, 50(1), 12-27 (2014).
- [24] Keh-Shaw Chen, Feng-Nien Ko, Che-ming Teng, Yang-Chang Wu: Antiplatelet and vasorelaxing action of some aporphinoids. *Planta Med*, 62(2), 133-136 (1996).
- [25] Boustie J., Stigliani J. L., Montahnha J., Amoros M., Payard M., Girre L.: Antipoliavirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 61/4, 480-484 (1998).
- [26] Fong P., Tong H. H.: In silico prediction of the cosmetic whitening effects of naturally occurring lead compounds. *Natural Product Communications*, 7/10, 1287-1294 (2012).
- [27] [www.alzheimercentrum.cz](http://www.alzheimercentrum.cz)
- [28] Feldman R. S., Meyer J. S., Quenzer L. F.: *Principles of Neuropsychopharmacology*. SINAUER ASSOCIATES, INC., PUBLISHERS, Sunderland (1997).
- [29] Masoumi J., Mortenza A., Reza P., Daryoush M., Graciela P., Abolfazi B., Jalal A.: Apelin, a promising target for Alzheimer disease prevention and treatment. *Clinical features and diagnosis of Alzheimer disease* (2017).
- [30] Czarneckaa K., Gireka M., Maciejewskaa K., Skibinski R., Jonczyk J., Bajdac M., Kabzinski J., Solowiejd P., Majsterek I., Szymanski P.: New cyclopentaquinoline hybrids with multifunctional capacities for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of enzyme inhibition and medical chemistry*, 33/1, 158-170 (2017).
- [31] Koukolík František, Jiráček Roman: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada Publishing, Vydání 1 (1998).
- [32] Sherva R., Kowall N. W.: *Genetics of Alzheimer disease*. (2017).
- [33] Keene D., Montine T., Kuller L.: *Epidemiology, pathology, and pathogenesis of Alzheimer disease*. (2018).

- [34] Wolk D. A., Dickerson B.: Clinical features and diagnosis of Alzheimer disease. (2017).
- [35] Xiaoqian Lin, Qingzhu Zhang: The drug development based on pathogenetic research in Alzheimer's disease. Pharmaceutical Institute of New drugs, School of Pharmacy, Shandong University, China (2014).
- [36] Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie. Vydání 2, Galén, (2005).
- [37] Zec R. F., Burkett N. R.: Non-pharmacological and pharmacological treatment of the cognitive and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *NeuroRehabilitation*, 23/5, 425-438 (2008).
- [38] Doležal M. a kol.: Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2013).
- [39] <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>, SPC rivastigmin, staženo 6.9.2018.
- [40] Guoyan Yang, Yuyi Wang, Jinzhou Tian, Jian-Ping Liu: Huperzine A for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analyses of Randomized clinical trials. *Centre for Evidence-based Chinese Medicine*, Beijing, China, 8, 9, 1-8 (2013).
- [41] Vališ M., Caisberger F., Šimůnek L., Linková H.: Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia* 6, 396 (2013).
- [42] Hošťálková A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drašar P., Cahlíková L.: Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití. *Chemické listy*, 109, 846-855 (2015).
- [43] Bruneton J.: *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Vydání 2, 915 (1993).
- [44] Hošťálková A.: Studium obsahových látek vybraných taxonů z řádů Laurales a Ranunculales s potenciálně neuroprotektivní aktivitou. Univerzita Karlova, Praha (2015).
- [45] Morais J., Barbosa-Filho R.: Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 62/1, 57-61 (1998).
- [46] Marcos Antonio A. Medeiros, Xirley P. Nunes, José M. Barbosa-Filho, Virginia S. Lemos, José F. Pinho, Danilo Roman-Campos, Isac A. de Medeiros, Demetrius Antonio M. Araújo, Jader S. Cruz: (S)-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of Pharmacology*, 376/2, 115-125 (2009).