

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické botaniky



Biologická aktivita sekundárných metabolitov rastlín XXX.  
Základný screening vybraných taxónov na anticholinesterázovú aktivitu

Diplomová práca

Vedúci katedry: prof. Ing. Lucie Čahlíková, Ph.D.

Vedúci diplomovej práce: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ 2020

DIANA KARAŠČÁKOVÁ

**Charles University**  
**Faculty of Pharmacy in Hracec Králové**

Department of Pharmaceutical Botany



Biological activity of plants secondary metabolites XXX.  
Basic search of selected taxons on anticholinesterase activity

Diploma thesis

Head of the department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Supervisor of the diploma thesis: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ 2020

DIANA KARAŠČÁKOVÁ

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Každá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Hradci Králové, august 2020

Diana Karaščáková

Ďakujem prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za odborné vedenie, poskytnuté materiály a ústretový prístup pri vypracovaní mojej diplomovej práce. Poďakovanie patrí PharmDr. Jiřímu Janouškovi, Ph.D. za pomoc pri stanovení biologickej aktivity extraktov a tiež PharmDr. Daniele Hulcovej, Ph.D., PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D., Mgr. Eliške Kohelovej za cenné rady. Ďakujem vedeniu a pracovníkom Katedry farmaceutickej botaniky za ochotnú pomoc pri riešení problémov a za príjemné pracovné prostredie. V neposlednom rade ďakujem svojej rodine za podporu počas celého štúdia na univerzite.

# Obsah

Zoznam použitých skratiek.....	6
Prehľad obrázkov a tabuliek.....	7
1 Úvod.....	8
2 Cieľ práce.....	9
3 Teoretická časť.....	10
3.1 Alzheimerova choroba.....	10
3.1.1 Úvod a charakteristika demencií.....	10
3.1.2 Charakteristika Alzheimerovej choroby.....	11
3.1.3 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby.....	15
3.1.3.1 Liečivá ovplyvňujúce acetylcholínergný systém.....	15
3.1.3.2 Liečivá blokujúce NMDA glutamátový receptor.....	16
3.1.4 Perspektívne smery v liečbe demencie.....	16
3.1.5 Adjuvantná terapia.....	18
3.2 Prírodné látky v terapii Alzheimerovej choroby.....	20
3.2.1 Inhibítory AChE a BuChE.....	20
3.2.2 Látky ovplyvňujúce nikotínové receptory.....	22
3.2.3 Látky ovplyvňujúce beta amyloid.....	23
3.2.4 Látky iného pôsobenia.....	24
3.3 Popis rastlinných taxónov.....	27
3.3.1 <i>Annona muricata</i> L.....	27
3.3.2 <i>Leonotis leonurus</i> (L.) R. Br.....	29
3.3.3 <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.....	31
3.3.4 <i>Hamelia patens</i> Jacq.....	34
3.3.5 <i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F. Gmel.....	37
3.3.6 <i>Allamanda cathartica</i> L.....	39
3.3.7 <i>Morinda citrifolia</i> L.....	41

4	Experimentálna časť .....	43
4.1	Všeobecné metódy .....	43
4.1.1	Príprava a čistenie rozpúšťadiel.....	43
4.1.2	Odparovanie rozpúšťadiel z extraktov a ich uchovávanie.....	43
4.2	Potreby.....	43
4.2.1	Rozpúšťadla a chemikálie pre prípravu extraktov a detekciu na TLC.....	43
4.2.2	Chemikálie a materiál pre stanovenie cholinesterázovej aktivity.....	44
4.2.3	Detekčné činidlá.....	45
4.2.4	Pomocné látky.....	47
4.2.5	Vyvíjacie sústavy pre TLC a chromatografické adsorbenty .....	47
4.2.6	Prístroje a ďalšie potreby.....	47
4.2.7	Vzorky morfológických častí rastlín.....	48
4.3	Príprava sumárneho a alkaloidného extraktu.....	48
4.3.1	Príprava sumárneho (etanolového) extraktu.....	48
4.3.2	Príprava alkaloidného (etylacetátového) extraktu .....	49
4.4	Kvalitatívna analýza oboch druhov extraktov na skupinové typy sekundárnych metabolitov (tenkovrstvová chromatografia).....	50
4.5	Stanovenie <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i> inhibície.....	51
4.5.1	Metodika predbežného testu .....	52
5	Výsledky .....	53
5.1	Výsledky kvalitatívnej analýzy extraktov na skupinové typy sekundárnych metabolitov .....	53
5.2	Výsledky inhibičnej aktivity extraktov .....	69
6	Diskusia.....	70
	Abstrakt .....	73
	Abstract.....	74
7	Literatúra.....	75

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekurzorový proteín
ApoE4	apolipoproteín E4
ATChI	acetylthiocholín jodid
ATP	adenozíntrifosfát
BACE	$\beta$ -sekretáza
BuChE	butyrylcholinesteráza
BuTChI	butyrylthiocholín jodid
CNS	centrálne nervová sústava
CT	počítačová tomografia
DMSO	dimetylsulfoxid
DTNB	5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EGb	Extractum ginkgo bilobae
GSK-3 $\beta$	glykogénsyntázakináza-3 $\beta$
<i>h</i> AChE	humánna acetylcholinesteráza
<i>h</i> BuChE	humánna butyrylcholinesteráza
ChAT	cholínacetyltransferáza
IC <sub>50</sub>	inhibičná aktivita
MAO-A	monoaminoxidáza typu A
MAO-B	monoaminoxidáza typu B
MMSE	mini-mental state examination
MR	magnetická rezonancia
MTDLs	multi-target-directed ligands
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
PET	pozitronová emisná tomografia
SNRI	inhibitory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu
SSRI	inhibitory spätného vychytávania serotonínu
TLC	tenkovrstvová chromatografia

## PREHLAD OBRÁZKOV A TABULIEK

Obrázok 1 Galantamín.....	20
Obrázok 2 Huperzín A.....	21
Obrázok 3 Juliflorín.....	22
Obrázok 4 Withaferín A .....	22
Obrázok 5 Anabaseín .....	23
Obrázok 6 Kurkumín.....	23
Obrázok 7 Berberín .....	24
Obrázok 8 Ginkgolid B .....	25
Obrázok 9 Ginsenozid Rg <sub>1</sub> .....	26
Obrázok 10 Krocín.....	26
Obrázok 11 <i>Annona muricata</i> L.....	27
Obrázok 12 Anonain .....	28
Obrázok 13 <i>Leonotis leonurus</i> (L.) R. Br.....	29
Obrázok 14 Leoleorín G.....	30
Obrázok 15 <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.....	31
Obrázok 16 Apigenín 7- <i>O</i> -glukozid.....	33
Obrázok 17 <i>Hamelia patens</i> Jacq.....	34
Obrázok 18 Izopteropodín .....	36
Obrázok 19 <i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F. Gmel. ....	37
Obrázok 20 Rhynchofylín.....	38
Obrázok 21 <i>Allamanda cathartica</i> L.....	39
Obrázok 22 Allamandicín.....	40
Obrázok 23 <i>Morinda citrifolia</i> L.....	41
Obrázok 24 Amerikanín A.....	42
Tabuľka 1 Pôvod použitých suchých morfológických častí rastlín .....	48
Tabuľka 2 Použité činidlá pre rámcovú detekciu sekundárnych metabolitov .....	50
Tabuľka 3 Výsledky inhibície.....	69



# 1 ÚVOD

Starnutím populácie v Českej republike a všetkých krajinách západného sveta dochádza k predlžovaniu strednej dĺžky života. Je to dané jednak trvalo klesajúcou pôrodnosťou a zároveň znižujúcou sa úmrtnosťou vo všetkých vekových skupinách. Pribúdajú preto chronické degeneratívne poruchy ako sú osteoporóza, kardiovaskulárne choroby, kognitívne poruchy a demencie<sup>1</sup>.

Alzheimerova choroba patrí medzi najčastejšie demencie, je to progresívne degeneratívne ochorenie centrálnej nervovej sústavy, ktoré sa vyznačuje charakteristickými klinickými a patofyziologickými príznakmi. Ochorenie sa prejavuje výpadkami pamäti a poruchou až stratou kognitívnych funkcií. Pri patogenéze vzniku Alzheimerovej choroby dochádza k ubúdaniu neurónov a zníženiu synaptickej plasticity. Prvým postihnutým neurotransmitterovým systémom je systém acetylcholínerný<sup>1</sup>.

Súčasná odporúčania pre liečbu Alzheimerovej choroby a ostatných demencií vychádzajú z medicíny založenej na dôkazoch. Zatiaľ nie je k dispozícii žiadna kauzálna terapia tohto neurodegeneratívneho ochorenia, ktorá by umožnila vyliečenie. Existujú však dva farmakoterapeutické prístupy ovplyvňujúce priebeh ochorenia, a to predovšetkým spomalenie progresie a oddialenie ťažkých štádií. Prvú skupinu liečiv predstavujú inhibítory cholinesteráz, ktoré zvyšujú hladinu acetylcholínu v mozgu a predstavujú najúčinnjšiu terapiu v liečbe ľahkej a stredne ťažkej demencie. Druhým prístupom sú antagonisti *N*-metyl-D-aspartátových glutamátergických receptorov<sup>2</sup>.

Procesy patofyziológie Alzheimerovej choroby, ktoré vedú k deštrukcii neurónov a strate mozgovej kôry sú komplikované a navzájom sa kombinujú. Spoločne s ich lepším porozumením sa objavujú aj nové možnosti ako terapeuticky ovplyvniť vznik a vývoj choroby. Spektrum používaných zlúčenín je obmedzené, a preto sa v súčasnosti hľadajú ďalšie perspektívne liečivá, aj medzi liečivami prírodného pôvodu. Medzi potenciálne látky patria tie, ktoré ovplyvňujú aktivitu sekretáz, inhibujú neuronálny zápal indukovaný  $\beta$ -amyloidom, zabraňujú fosforylácii  $\tau$ -proteínu a ďalšie<sup>3</sup>.

Táto práca vychádza z činnosti výskumnej skupiny ADINACO, ktorá sa zaoberá štúdiom sekundárnych metabolitov rastlín a sledovaním ich biologickej aktivity. Jej zámerom je tiež hľadanie látok potenciálne uplatniteľných v terapii Alzheimerovej choroby, prípadne ich využitie v terapii nádorových ochorení.

## 2 CIEĽ PRÁCE

V rámci tejto diplomovej práce bol vykonaný screening morfológických častí vybraných taxónov vyšších rastlín z hľadiska schopnosti ich sekundárnych metabolitov inhibovať ľudskú acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu.

Ciele experimentálnej práce sú nasledujúce:

1. Spracovanie údajov z literatúry na taxóny s obsahom sekundárnych metabolitov, u ktorých je predpoklad neurotrópnej aktivity, väčšinou na základe tradičnej ľudovej medicíny.
2. Výber 7 taxónov vyšších rastlín a zaistenie vzoriek morfológických častí.
3. Príprava sumárnych etanolových extraktov, vyčistených etylacetátových extraktov a vykonanie tenkovrstvovej chromatografie a skupinovej detekcie látok.
4. Stanovenie inhibičnej aktivity na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu u oboch typov extraktov.
5. Spracovanie výsledkov a navrhnutie taxónov potenciálne uplatniteľných v ďalšom štúdiu.

## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Alzheimerova choroba

#### 3.1.1 Úvod a charakteristika demencií

Organické duševné poruchy sú spôsobené ochorením, úrazom alebo iným poškodením mozgu a vedú k prechodnej alebo stálej mozgovej dysfunkcii. Ich spoločným znakom je narušenie kognitívnych funkcií, liečba je väčšinou iba symptomatická. Najčastejšími a najvýznamnejšími poruchami sú práve demencie, ktorých hlavným rizikovým faktorom je vek<sup>4</sup>.

Z epidemiologického hľadiska je situácia v Českej republike podobná ako v ostatných krajinách Európy. Vo veku 65 rokov je postihnutých počiatočnou demenciou 5 % obyvateľov a potom sa každých 5 rokov výskyt demencie zdvojnásobuje, čo v populácii 80 ročných predstavuje 25 – 30 % ľudí s rôznym stupňom rozvoja demencie. Vzhľadom na vekové rozloženie to znamená približne 10 % populácie nad 65 rokov. Odhaduje sa, že v nasledujúcich 30 rokoch dôjde v Českej republike k zvýšeniu počtu obyvateľov trpiacich touto chorobou zo súčasných 150 000 na 380 000<sup>5</sup>.

Pri demencii dochádza k narušeniu vyšších kôrových funkcií, vrátane pamäti, myslenia, orientácie, schopnosti reči, učenia a úsudku, pričom zhoršenie týchto funkcií je sprevádzané zhoršením kontroly emócií, sociálneho správania a motivácie. Ide o získanú poruchu poznávacích funkcií, ktorá má zásadný vplyv na ďalšie funkcie a tým aj život pacienta<sup>1</sup>.

Demencie sa didakticky delia na primárne pri neurodegeneratívnej dysfunkcii mozgu, kde patrí napríklad aj Alzheimerova choroba (AD), demencia s Lewyho telieskami, frontotemporálna demencia. Sekundárne symptomatické demencie sú také, kedy je mozog postihnutý ako jeden z orgánov pri celkovom ochorení organizmu<sup>4</sup>. Sekundárne demencie sú nesúrodou skupinou ochorení, kde patria napríklad vaskulárne demencie, posttraumatické, infekčné, metabolické pri poruchách pečene, respiračného systému, obličiek, ďalej pri nedostatku vitamínov, endokrinných ochoreniach, pri tumoroch a epilepsii<sup>1</sup>.

Najčastejšou príčinou demencie je AD, pričom väčšina demencií je zmiešaných, kedy u jedného pacienta sa vyskytuje viacero ochorení mozgu súčasne<sup>4</sup>.

### 3.1.2 Charakteristika Alzheimerovej choroby

V roku 1906 predniesol nemecký psychiater Alois Alzheimer na 37. schôdzi juhonne-meckých psychiatrov v Tübingene prednášku o 51 ročnej žene s demenciou, známej ako Augusta D., u ktorej popísal klinické príznaky demencie. Skúmal jej mozog a popísal typické neuropatologické zmeny. Pri autopsii mozgu našiel neuritické plaky, neurofibrilárne kľbka a arteriosklerotické zmeny. Choroba bola neskôr nazvaná jeho menom<sup>4</sup>.

Alzheimerova choroba je progredientné neurodegeneratívne ochorenie definované patologickými nálezmi, v ktorých existuje určitá interindividuálna variabilita týkajúca sa doby vzniku, rýchlosti progresie, prítomnosti genetických a ďalších faktorov ovplyvňujúcich rozvoj a priebeh choroby<sup>6</sup>.

Najvýznamnejším a zároveň neovplyvniteľným rizikovým faktorom je vek pacienta. Medzi riziká patrí tiež prítomnosť alely pre apolipoproteín E4 (ApoE4), vaskulárneho ochorenia, ďalej ženské pohlavie, nižšie vzdelanie, úrazy hlavy. Genetické faktory sa týkajú zmien, ktoré sú pravdepodobne zakódované na štyroch chromozómoch. Na chromozómoch 1 a 14 sú gény pre presenilíny 1 a 2, chromozóm 19 je spájaný so zvýšenou tvorbou lipoproteínov E4. Mutácia chromozómu 21 spôsobuje zvýšenú tvorbu amyloidového prekursorového proteínu<sup>1,7</sup>.

Ochorenie sa prejavuje kortiko-subkortikálnou atrofiou, pozorovateľnou makroskopicky, pri ktorej môžeme pozorovať stenčenie mozgovej kôry, rozšírenie zárezov a mozgových komôr, predovšetkým temporálnych rohov postranných komôr. Atrofii podliehajú aj oblasti hipokampu<sup>1</sup>.

Mikroskopicky sú nachádzané extracelulárne a intracelulárne zmeny. V extracelulárnych priestoroch mozgového kortexu sa nachádzajú chumáče rozpadnutých nervových vlákien, v ktorých sa v strede objavuje hrudka tvorená bielkovinou  $\beta$ -amyloidom, preto vznikla hypotéza, že  $\beta$ -amyloid poškodzuje výbežky nervových buniek. Medzi ďalšie charakteristické neuropatologické nálezy pri Alzheimerovej chorobe patrí samotná tvorba  $\beta$ -amyloidu a formácia plakov, degenerácia  $\tau$ -proteínu a tvorba neurofibrilárnych uzlíkov, sterilný zápal a pôsobenie voľných kyslíkových radikálov, nedostatok nervových rastových faktorov, vysoký obsah monoaminoxidázy typu B (MAO-B), selektívny zánik predovšetkým acetylcholínergných neurónov<sup>6</sup>.

Tvorba patologických proteínov je typickým nálezom pri AD.  $\beta$ -Amyloid je dôležitý degeneratívny proteín tvoriaci základ alzheimerovských plakov, okolo ktorých dochádza k vzniku sterilného zápalu a spusteniu ďalších neurodegeneratívnych proce-

sov. Jeho ukladaním v stenách mozgových ciev vzniká amyloidná angiopatia. Zdrojom  $\beta$ -amyloidu je amyloidový prekursorový proteín (APP), ktorý je za fyziologických podmienok štiepený enzýmom  $\alpha$ -sekretázou na fragmenty solubilné a neuroprotektívne, nazývané  $\beta$ -peptid. Avšak za patologického stavu sa presadzujú enzýmy  $\beta$ -sekretáza (BACE) a  $\gamma$ -sekretáza, ktoré štiepia APP na iných miestach, vznikajú tak fragmenty dlhšie. Tieto atypické fragmenty nie sú rozpustné, v extracelulárnych priestoroch kortexu koagulujú a polymerizujú, čím vzniká samotný  $\beta$ -amyloid. Existuje tiež hypotéza, že ku koagulácii rozpustného  $\beta$ -peptidu prispieva prítomnosť ApoE4<sup>6</sup>.

Ďalším patologickým proteínom je nadmerne fosforylovaný  $\tau$ -proteín neurónových mikrotubulov. Zatiaľ čo defosforylovaný  $\tau$ -proteín stabilizuje neuronálne tubuly, hyperfosforylovaná forma ich polymerizuje, vytvára párovo helikálne filamenty, ktoré tvoria základ neurofibrilárnych uzlíkov. Degenerácia je spustená enzýmami proteínkinázami, predovšetkým glykogénsyntázoukinázou-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), ktorá je pravdepodobne aktivovaná  $\beta$ -amyloidom. Takto postihnuté neuróny podliehajú apoptóze<sup>6</sup>.

Tieto dve základné neurobiologické zmeny spúšťajú kaskádu ďalších degeneratívnych prejavov. V oblasti plakov dochádza k sterilnému zápalu, aktivácií gliových elementov a buniek mikroglíí. Aktivuje sa zápalový enzým cyklooxygenáza, uvoľňujú sa cytokíny a voľné kyslíkové radikály. Za patologických podmienok nadmerne uvoľňované voľné kyslíkové radikály, vyvolávajú peroxidáciu lipidov bunkovej membrány neurónov a tým spôsobujú ich zánik. Vo zvýšenej miere sú uvoľňované aj excitačné aminokyseliny (glutamát, aspartát), ktoré po väzbe na ionotropné *N*-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory otvárajú iónové kanály, čo vedie k nadmernému influxu kalcia do neurónov. Dochádza tým k destabilizácii vnútorného prostredia neurónov a následnej aktivácii apoptických mechanizmov a zániku neurónov<sup>1</sup>.

Pri Alzheimerovej degenerácii dochádza k poklesu niektorých neurónov, počtu synapsí a k zníženiu plasticity neurónov. Z neuromediátorových systémov je najviac postihnutý systém cholínergny, významný pre kognitívne funkcie. Narušená je syntéza acetylcholínu (ACh) v presynaptickej oblasti neurónu, jeho uvoľňovanie a taktiež schopnosť spätného vychytávania cholínu do neurónu. Navyše je prítomný deficit enzýmu cholínacetyltransferázy (ChAT), ktorý syntetizuje ACh z acetylkoenzýmu A a cholínu. Postsynapticke aj presynapticke muskarínové a nikotínové acetylcholínergné receptory zostávajú relatívne zachované. V neskorších štádiách demencie dochádza k ich degenerácii a postihnutiu aj ďalších neurotransmitterových systémov (somatostatí-

nu, serotonínu, noradrenalínu, kyseliny  $\gamma$ -aminomaslovej, substancie P a neuropeptidu Y)<sup>1,7</sup>.

ACh je v synaptickej štrbine odbúraný enzýmom acetylcholinesterázou (AChE). V ľudskom mozgu sa vyskytujú dve formy tohto enzýmu, a to tetramer G4, ktorý za fyziologických podmienok prevláda a monomer G1, ktorého podiel sa zvyšuje pri AD. V pokročilejších štádiách tejto choroby sa na odbúraní výrazne podieľa aj enzým butyrylcholinesterázy (BuChE), tvorený gliovými elementami v oblasti plakov<sup>1,6</sup>.

Ďalšími patogenetickými zmenami sú neuronálny hypometabolizmus vznikajúci vplyvom poškodenia mitochondrií, mutácia mitochondriálnej DNA, znížená oxidácia glukózy, hyperaktivita sukcinyldehydrogenázy a ostatných enzýmov. Napríklad zvýšená hladina MAO-B je dôvodom väčšej biodegradácie dopamínu, pri ktorej sa uvoľňujú voľné kyslíkové radikály. Predpokladá sa tiež nedostatok nervových rastových faktorov, vytváraných gliovými bunkami, dôležitých pre nervovú plasticitu<sup>6</sup>.

K základným diagnostickým kritériám demencie patrí zlyhávanie pri zvládaní denných aktivít a strata sebestačnosti v dôsledku narušenia kognitívnych funkcií<sup>4</sup>.

Základom diagnostického procesu je podrobná anamnéza od opatrovateľa, psychiatrické vyšetrenie so základnými neuropsychologickými testami (test psychických funkcií (MMSE), test kresby hodín, vyšetrenie fatických funkcií), neurologické a interné vyšetrenie. Vhodné je tiež biochemické vyšetrenie krvi<sup>4</sup>.

Zobrazovacie vyšetrenia mozgu, ako sú počítačová tomografia (CT), magnetická rezonancia (MR), pozitronová emisná tomografia (PET), nedokážu diagnózu demencie potvrdiť, ale vylúčia iné príčiny poruchy psychického stavu ako neurodegeneratívne, a to napríklad vnútrolebkový hematóm, mozgové tumory a mozgové infarkty<sup>4</sup>.

Ku klinickej diagnóze pravdepodobnej AD sa dá dospieť kombináciou MR mozgu, špecializovaných psychometrických testov a vyšetrenia hladín niektorých proteínov v mozgomiechovom moku, ktorým začína byť v súčasnosti venovaná veľká pozornosť. Napríklad hladina  $\beta$ -amyloidu v mozgomiechovom moku je paradoxne znížená oproti zdravým ľuďom a hladina  $\tau$ -proteínu a fosforylovaného  $\tau$ -proteínu v mozgomiechovom moku je zvýšená u AD oproti zdravým ľuďom<sup>4</sup>.

K základným klinickým príznakom patria kognitívne poruchy ako sú poruchy pamäti, intelektu. Sú postihnuté aj iné psychické funkcie ako myslenie, orientácia v čase a priestore, osobnosť, emócie, vôľa, jednanie, vnímanie<sup>4</sup>.

Syndróm demencie je charakterizovaný kognitívnou poruchou a ďalšími psychickými symptómami a poruchami správania. Rôzne štádia Alzheimerovskej demencie sú definované na základe klinického pohľadu a potrieb pacientov v jednotlivých fázach rozvoja<sup>8</sup>.

Prvé štádium začínajúcej a miernej demencie ako stav, kedy je pacient ešte prevažne sebestačný. U pacientov je však rozvinutá porucha kognitívnych funkcií, ktorá je dobre kompenzovaná rôznymi opatreniami. Kľúčovým momentom v tejto fáze je správne stanovenie diagnózy a jej oznámenie pacientovi. V tejto fáze zdôrazňujeme podporu, pomoc rodiny aj psychologickú pomoc a poradenstvo. V terapeutickom pláne u pacienta s AD predstavujú jednoznačnú voľbu kognitíva, ktorých efekt je symptomatický. V súčasnosti sa klinické skúšania zaoberajú možnosťou imunoterapie a ďalšími liečivami ovplyvňujúcimi sekretázu, agregáciu amyloidu a podobne. Dôležité je sledovať úroveň kognitívnych funkcií a pátrať po príznakoch depresie a úzkosti, aby sa včas zahájila potrebná farmakoterapia<sup>8,9</sup>.

V druhom štádiu stredne pokročilej a rozvinutej demencie pri AD dochádza k výraznému obmedzeniu sebestačnosti v základných aktivitách denného života. Pacienti nie sú schopní samostatne žiť, v tejto fáze demencie sa môžu veľmi ľahko dostať do neočakávanej a nebezpečnej situácie. Poruchy správania sa dajú zvládať psychosociálnymi intervenciami a psychotropná medikácia by nemala byť pokiaľ možno v tejto fáze používaná. Dôležitým prínosom pre pacientov sú zmysluplné denné činnosti a rozvrhnutie dňa, ktoré bude najviac rešpektovať ich doterajšie návyky. Do zásad farmakoterapie patrí vypracovanie vhodného plánu liečby kognitívami, pretože práve tá môže viesť s lepším porozumením daným situáciám spoločne s nefarmakologickými metódami. Ďalej je možné nastaviť terapiu memantínom, buď v monoterapii, prípadne ku kognitívam<sup>8,9</sup>.

V štádiu ťažkej demencie v dôsledku progresie syndrómu postupne dochádza k zhoršovaniu celkového stavu, sebestačnosti. Vyskytujú sa komplikácie ako somatické, tak aj psychické. Pacienti potrebujú individualizovanú asistenciu, pretože ochorenie už prešlo do stavu, kedy programované denné aktivity im prinášajú viac dyskomfortu, mnohým z nich nerozumejú. Aj v tejto fáze dbáme o zachovanie prirodzeného diurnálneho rytmu a účasti na zmysluplnom živote. Je potrebné, aby starostlivosť bola poskytovaná kvalifikovanými a v problematike demencie poučenými zdravotníkmi, ktorí budú vedieť adekvátne reagovať na vyskytnuté komplikácie<sup>8,9</sup>.

Starostlivosť o pacienta s demenciou v terminálnom štádiu ochorenia spôsobujú-  
cich demenciu má byť starostlivosťou paliatívnou, ktorá bude dbať predovšetkým na  
zlepšenie kvality života. V tejto fáze je potrebné dostatočné zaistenie analgetikami, zva-  
žujeme aj benzodiazepíny s ohľadom na bolestivé kŕče a kontraktúry, snažíme sa  
o adekvátnu potrebnú hydratáciu<sup>8,9</sup>.

### 3.1.3 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby

#### 3.1.3.1 Liečivá ovplyvňujúce acetylcholinergný systém

Acetylcholinergný systém je prvým neurotransmiterovým systémom, ktorého funkcia je  
pri AD narušená. Prítomný je deficit enzýmu ChAT, ktorý syntetizuje ACh, je obme-  
dzené spätné vychytávanie cholínu zo synaptickej štrbiny a je zvýšená tvorba BuChE,  
ktorá taktiež odbúrava ACh. Tento systém je nevyhnutný pre pamäťové mechanizmy,  
pre krátkodobú pamäť a zapamätanie si nových informácií<sup>10</sup>.

Používajú sa inhibítory mozgových cholinesteráz, ktoré priaznivo ovplyvňujú  
centrálny acetylcholinergný prenos. Táto skupina kognitív tvorí základ pre liečbu ľah-  
kých a stredných štádií Alzheimerovských demencií, v štúdiách bol preukázaný ich  
efekt aj u ťažších foriem. Zablokovaním enzýmov odbúravajúcich ACh sa zvyšuje počet  
molekúl ACh schopných väzby na svoje nikotínové a muskarínové receptory<sup>11</sup>.

Inhibítory cholinesteráz by mali dobre prechádzať hematoencefalickou bariérou,  
ovplyvňovať obe formy mozgových AChE a zároveň neovplyvňovať periférne formy  
cholinesteráz<sup>11</sup>. Ďalej je u nich predpoklad zásahu do neuropatologického deja, do tvor-  
by  $\beta$ -amyloidu tak, že znižujú jeho tvorbu ovplyvnením enzýmov  $\gamma$ -sekretáz<sup>12</sup>.

V súčasnosti sú používané tri inhibítory mozgových cholinesteráz. Donepezil  
ako reverzibilný nekompetitívny inhibítor AChE s vysokým stupňom selektivity  
k centrálnej forme enzýmu a nízkou afinitou k periférnym formám. Rivastigmín je inhi-  
bitor AChE aj BuChE, karbamátového typu<sup>5</sup>. Galantamín je alkaloid, ktorý má dualis-  
tické pôsobenie na acetylcholinergný systém, kedy reverzibilne inhibuje AChE  
a allostericky moduluje nikotínové receptory<sup>12</sup>.

Perspektívnou látkou v štádiu klinických skúšok je preparát označený názvom  
TAK-157, ktorý je inhibítorom AChE a zároveň uvoľňuje nervové rastové faktory<sup>12</sup>.



### 3.1.3.2 Liečivá blokujúce NMDA glutamátový receptor

Ďalším zasiahnutým systémom je systém glutamátergický. Dochádza k nadmernému uvoľneniu glutamátu a ďalších excitačných aminokyselín, zníženému spätnému vychytávaniu glutamátu. Ten sa nadmerne viaže na svoje ionotropné receptory typu NMDA, dochádza k nadmernému otvoreniu kalciových kanálov, k zvýšenému vstupu kalcia do neurónov a následne sa spúšťa kaskáda dejov, ktoré vedú v konečnom dôsledku k neuronálnej apoptóze. Navyše NMDA receptory sa podieľajú na jednom zo základných dejov učenia dlhodobou potenciáciou, kedy je tento proces vplyvom hyperexcitácie NMDA receptorov narušený<sup>10</sup>.

Používa sa memantín, nekompetitívny antagonista NMDA receptorov, ktorý chráni neuróny pred excitotoxickým pôsobením glutamátu tým, že nahradí na iónovom kanáli  $Mg^{2+}$  a blokuje vstup  $Ca^{2+}$  iónov do buniek. Vďaka jeho nízkej afinite a vysokej napät'ovej závislosti po impulze rýchlo opúšťa iónový kanál, čím umožňuje glutamátu vykonávať svoju fyziologickú funkciu v procese učenia a pamäti. Dokáže ovplyvniť aj stredne ťažké a ťažké formy demencie, ktoré boli považované sa terapeuticky neovplyvniteľné<sup>13</sup>.

### 3.1.4 Perspektívne smery v liečbe demencie

V súčasnosti klinicky používané liečivá memantín a inhibítory AChE predstavujú symptomatickú liečbu, ktorá nedokáže zastaviť progresiu demencie, ale vedie k zmierneniu príznakov a k dočasnému spomaleniu straty kognitívnych a behaviorálnych funkcií. Napriek množstvu klinických štúdií, v posledných rokoch neboli schválené žiadne nové látky na liečbu AD. Dôvodom ich neúspechu boli predovšetkým závažné nežiadúce účinky alebo nedostatočná terapeutická účinnosť týchto liečiv<sup>14</sup>.

Pri vývoji a progresii tohto ochorenia je narušený serotonínerný neurotransmiterový systém, pričom sa predpokladá, že ovplyvnením  $5-HT_6$  receptorov exprimovaných primárne v oblasti mozgu zapojených do procesov učenia a pamäti môžeme zvýšiť cholínernú neurotransmisiiu. Medzi antagonistov týchto receptorov patrí idalopirdín, ktorý spočiatku vykazoval priaznivé výsledky, avšak v III fáze klinickej štúdie nepreukázal svoju účinnosť oproti placebo. Ďalšou testovanou látkou je intepirdín, ktorý sa doposiaľ javí ako nádejný, a to v kombinácií s donepezilom<sup>14</sup>.

Skúšanou látkou bol aj enceniclín, parciálny selektívny agonista  $\alpha 7$  nikotínových acetylcholínových receptorov, ktorý pôsobí zvýšením cholínernej signalizácie, dôleži-

tej pre liečbu kognitívnych deficitov a poškodenia pamäti. Pôsobí aj ako nosič naviazaného extracelulárneho  $\beta$ -amyloidu, čím inhibuje jeho neurotoxicitu. Klinické štúdie boli pozastavené v III fáze, kedy sa zistilo, že vykazuje gastrointestinálne nežiaduce účinky<sup>14</sup>.

Cieľ pôsobenia terapeutík by mohli predstavovať sekretázy, enzýmy zohrávajúce základnú úlohu pri štiepení APP a pri vytváraní  $\beta$ -amyloidu. Inhibítory BACE tretej generácie vykazujú vyhovujúcu farmakokinetiku a klinické údaje v prebiehajúcich štúdiách. Ide predovšetkým o látky E2609, AZD3293, CNP520 a JNJ-5486191. Látka verubecestat síce znižovala množstvo  $\beta$ -amyloidu v centrálnej nervovej sústave (CNS), avšak klinické štúdie boli zastavené z dôvodu nedostatočnej účinnosti u pacientov trpiacich miernou až stredne ťažkou formou demencie. Ďalšou možnosťou je inhibícia  $\gamma$ -sekretázy, enzýmu pozostávajúceho zo štyroch podjednotiek, pričom každá z nich predstavuje potenciálny cieľ liečiv pre moduláciu produkcie  $\beta$ -amyloidu a zvýšenie jeho odbúravania. Bolo testovaných niekoľko látok, tie však nevykazovali priaznivé výsledky, a preto boli ich klinické štúdie prerušené. V II fáze testovania je NIC5-15, pinitol, prirodzene sa vyskytujúci cyklický cukrový alkohol, ktorý moduláciou  $\gamma$ -sekretázy znižuje produkciu  $\beta$ -amyloidu<sup>14</sup>.

Skúmaným terapeutickým prístupom k AD je aj imunoterapia proti  $\beta$ -amyloidu. V štúdiách aktívnej imunizácie je látka CAD106, ktorej cieľom je vyvolať silnú protilátkovú reakciu a súčasne zabrániť zápalovej aktivácii T-lymfocytov. Pasívna imunizácia, ktorá patrí medzi najpokročilejšie stratégie v terapii, využíva princíp zachovania umelých hladín protilátok proti  $\beta$ -amyloidu. Vo fáze klinického výskumu sú napríklad látky crenezumab, gantenerumab a aducanumab<sup>14</sup>.

V súčasnosti sa zvyšuje záujem o možnosť ovplyvnenia  $\tau$ -proteínu prostredníctvom zlúčenín, ktoré by viedli k zníženiu, stabilizácii a prevencii jeho agregácie a hyperfosforylácie. Terapeutické využitie by mohli mať najmä inhibítory agregácie  $\tau$ -proteínu, z ktorých testovanou látkou v III fáze je TRx0237. Jedným z testovaných prístupov sú látky, ktoré zvyšujú odbúravanie fosforylovaného  $\tau$ -proteínu pomocou aktívnej imunizácie<sup>14,15</sup>.

Nakoľko sa predpokladá súvislosť medzi zápalom navodenou hyperaktiváciou mikroglíí pri tvorbe amyloidných plakov a progresiou demencie, boli vyvinuté inhibítory mikroglialnej aktivácie. Medzi tieto látky patrí azeliragon, v III fáze štúdií, ktorý je spájaný so znížením hladiny  $\beta$ -amyloidu v mozgu a zlepšením kognitívnych funkcií<sup>14</sup>.

Plazmaferéza predstavuje nepriamu metódu ovplyvnenia  $\beta$ -amyloidu. Táto metóda je založená na predpoklade, že existuje dynamická rovnováha medzi pomerom amyloidu v likvore a v periférnej krvi. Mechanizmus liečby spočíva v zistení, že zníženie jeho hladín v periférnej krvi vedie k zníženiu hladín v likvore. Prvé výsledky vykazujú pozitívny vplyv na kognitívne funkcie, praktickému využitiu však bude brániť procedurálna zložitosť liečby<sup>15</sup>.

Novinkou v klinickej praxi dostupných kognitív sú nové aplikačné liekové formy, ktorých užitie zmiernuje výskyt niektorých nežiadúcich účinkov. Zavádzané sú napríklad náplasti a roztoky, ktoré súčasne umožňujú jednoduchšie podanie<sup>15</sup>.

### 3.1.5 Adjuvantná terapia

Pri AD sú terapeuticky skúšané nootropika a ďalšie látky zvyšujúce mozgový metabolizmus, kde patrí napríklad piracetam, nicergolín. Používaný štandardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* L. pôsobí aj ako vychytávač voľných kyslíkových radikálov, inhibítor NMDA receptorov, má tiež vazoaktívne vlastnosti. Voľné kyslíkové radikály, ktorých je uvoľňované nadmerné množstvo, urýchľujú apoptické deje. Na ich odstránenie sa podieľajú vychytávače, medzi ktoré tiež zaradzujeme  $\alpha$ -tokoferol, melatonín, resveratrol a ďalšie. Inhibítor MAO-B, selegilín inhibuje odbúravanie dopamínu, dej, pri ktorom vzniká veľké množstvo týchto radikálov<sup>12</sup>.

Nervových rastových faktorov, ktoré sa podieľajú na neuronálnej plasticite a na reparačných procesoch je nedostatok. Používa sa preto cerebrolyzín, hydrolyzát bravčových mozgov obsahujúci peptidy. Podávanie estrogénov u postklímakterických žien má skôr preventívny význam. Tie okrem uvoľňovania rastových faktorov stimuláciou svojich receptorov, zlepšujú prekrvenie mozgu<sup>12</sup>.

Pri Alzheimerovej demencii sú časté neuropsychiatrické symptómy. Tieto ťažkosti oproti kognitívnym poruchám spôsobujú viaceré komplikácie, významnejšie zníženie kvality života a pre pacientov sú veľmi zaťažujúce. Medzi najčastejšie symptómy patrí depresia a úzkosť, postupne sa objavujú aj agitácia, agresia, bludy, halucinácie, apatia a poruchy spánku. Individuálne volíme medzi zástupcami atypických antipsychotík (kvetiapín, risperidón, olanzapín), ktoré majú najväčšie využitie. V terapii demencie našli najväčšie uplatnenie inhibítory spätného vychytávania serotonínu (SSRI) (citalopram, escitalopram, sertralín). Používajú sa aj inhibítory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu (SNRI) (venlafaxín) a inhibítor monoaminoxidázy typu A

(MAO-A) (moklobemid). Pri výbere farmakoterapie je nutné rozlišovať medzi rozdielnou efektivitou a bezpečnosťou jednotlivých látok. Špecifikom liečby je dôraz kladený na nefarmakologické opatrenia slúžiace na odstránenie a zmiernenie príznakov choroby<sup>16</sup>.

Neoddeliteľnou súčasťou liečby je správny psychologický prístup k chorému, ktorý vyžaduje veľkú trpezlivosť od ošetrojúcich. S progresiou demencie a degradáciou pacientovej premorbidnej osobnosti je nutné používať stále jednoduchšie psychoterapeutické metódy, ktorých snahou je udržať pacienta čo najdlhšie zapojeného do aktivít bežného života. Najdôležitejšou úlohou pre pacienta je precvičovanie pamäti a rôznych zručností neustálou aktivizáciou, stimuláciou a konfrontáciou s realitou<sup>7</sup>.

## 3.2 Prírodné látky v terapii Alzheimerovej choroby

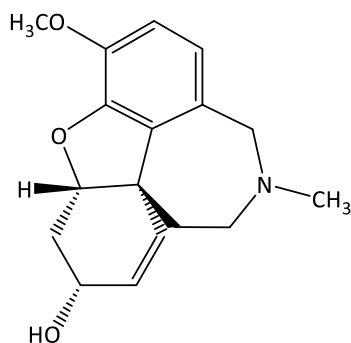
### 3.2.1 Inhibitory AChE a BuChE

#### Galantamín

Galantamín bol pôvodne izolovaný z *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae) v 40. rokoch 20. storočia a neskôr aj z ďalších druhov rastlín čeľade Amaryllidaceae. Patrí medzi izochinolínové alkaloidy. Ide o dlhodobý pôsobiaci, selektívny, reverzibilný a kompetitívny inhibitor AChE, ktorý tiež allostericky moduluje pre- aj postsynaptické receptory<sup>17</sup>.

Galantamín pôsobí neuroprotektívne proti toxicite  $\beta$ -amyloidu a oxidatívne stresu. Znižuje tvorbu voľných kyslíkových radikálov jednak inhibíciou AChE a jednak allosterickou moduláciou  $\alpha 7$  podjednotiek nikotínových acetylcholínergných receptorov. Ďalej pôsobí protizápalovo prostredníctvom imunomodulácie, zníženého uvoľňovania zápalových cytokínov a protektívne proti poruchám membránovej fluidity a mitochondriálneho membránového potenciálu<sup>18</sup>.

Používa sa v terapii ľahkej a stredne ťažkej demencie pri AD, pričom pre terapeutické použitie je vyrábaný aj synteticky. Preukázal sa jeho priaznivý efekt nielen na kognitívne funkcie, ale aj na behaviorálne a psychologické príznaky demencie. Veľmi dobre sa vstrebáva po perorálnom podaní a jeho dávka sa postupne titruje. V súčasnosti je preferovaná forma s predĺženým uvoľňovaním, u ktorej sa liečba zahajuje dávkou 8 mg 1× denne a zvyšuje sa až na dávku 24 mg 1× denne<sup>18</sup>.



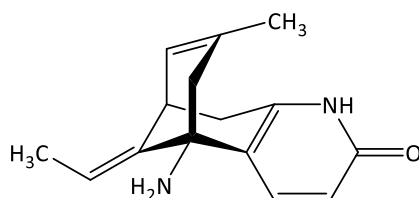
Obrázok 1 Galantamín

#### Huperzín A

Huperzín A je alkaloid, ktorý sa vyskytuje v rastline *Huperzia serrata* (Thunb. Ex Murray) Trevis. (Huperziaceae) a dlhé stáročia sa používa v tradičnej čínskej medicíne na liečbu širokého spektra chorôb. Primárne inhibuje G4 formu AChE, ktorá je podstatnej-

šia z hľadiska predĺženého pôsobenia ACh a uľahčenia synaptickej neurotransmisie. Popísané boli aj ďalšie účinky ako zníženie  $\beta$ -amyloidom vyvolanej degenerácie neurónov, zmiernenie apoptických procesov indukovaných  $\beta$ -amyloidom a voľnými radikálmi, inhibícia glutamátom spôsobenej toxicity<sup>19</sup>.

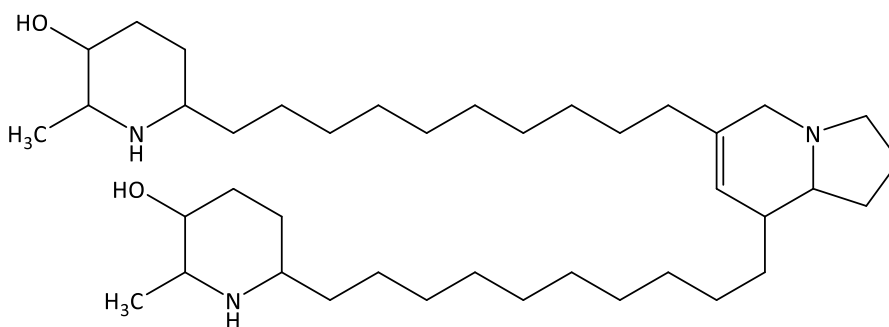
U huperzínu A označovaného ako silný, reverzibilný, selektívny inhibítor AChE bol vykonaný veľký počet preklinických a klinických štúdií hodnotiacich účinnosť a bezpečnosť, ktoré preukázali potenciálny účinok huperzínu A v liečbe AD. Na základe vykonanej metaanalýzy sa zistilo, že vykazuje niektoré priaznivé účinky na zlepšenie kognitívnych funkcií a aktivít denného života, avšak na jeho zavedenie do terapeutického použitia sú potrebné prísnejšie klinické štúdie monitorujúce dlhodobú bezpečnosť liečby<sup>20</sup>.



Obrázok 2 Huperzín A

### Juliflorín

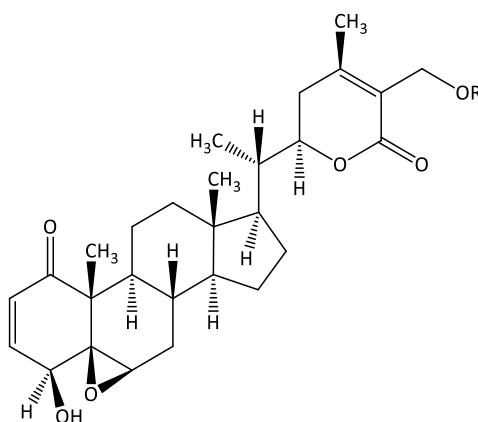
Alkaloid juliflorín, derivát piperidínu a indolizínu, získaný z listov rastliny *Propolis juliflora* (Sw.) DC. (Fabaceae) je nekompetitívnym inhibítorom enzýmov AChE a BuChE v závislosti od koncentrácie. Pri preskúmaní možných spôsobov interakcie tejto zlúčeniny s aktívnym centrom AChE sa zistilo, že vzniknutý komplex enzým-inhibítor je stabilizovaný hydrofóbnymi, vodíkovými väzbami a  $\pi$ - $\pi$  interakciami. Juliflorín tiež vykazuje spasmolytickú aktivitu a blokovanie vápnikových kanálov buniek na izolovanom jejune kráľika. Vďaka týmto účinkom a priaznivému bezpečnostnému profilu testovaného na ľudských neutrofiloch sa považuje za vhodného kandidáta na liečbu AD<sup>21</sup>.



Obrázok 3 Juliflorín

### Withaferín A

Withanolidy sú skupinou prirodzene sa vyskytujúcich sekundárnych metabolitov v ajurvédскеj rastline *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae) so štruktúrou steroidov s laktónovým postranným reťazcom. Z nich predovšetkým withaferín A je významný svojou inhibičnou aktivitou na cholinesterázy. Inhibuje aktivitu BuChE (IC<sub>50</sub> 125,0 μM), a tiež je účinný proti AChE (IC<sub>50</sub> 84,0 μM). Tieto vlastnosti mu udávajú určitý potenciál zlepšovať nedostatočnú cholinergnú funkciu v mozgu. Považuje sa preto za nového kandidáta pre terapeutickú liečbu a prevenciu AD a ďalších demencií<sup>22</sup>.



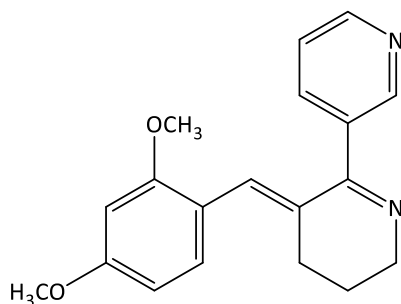
Obrázok 4 Withaferín A

### 3.2.2 Látky ovplyvňujúce nikotínové receptory

#### Anabaseín

Anabaseín je látka izolovaná z pásnice *Amphiporus lactifloreus* Johnston (Amphiporidae). Pri syntéze skupiny derivátov tohto toxínu sa zistilo, že analóg DMXB, označovaný aj GTS-1, má cytoprotektívne účinky. Zvyšuje pamäťové funkcie vďaka schop-

nosti ovplyvňovať  $\alpha 4\beta$  a  $\alpha 7$  podtypy nikotínového receptora. V súčasnosti je vo fáze klinického testovania ako potenciálna látka proti AD<sup>23</sup>.



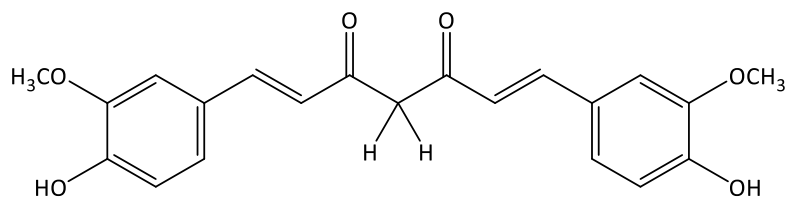
Obrázok 5 Anabaseín

### 3.2.3 Látky ovplyvňujúce beta amyloid

#### Kurkumín

Z rastliny *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) je získavaný polyfenol kurkumín, ktorý je súčasťou tradičnej čínskej medicíny a indickej medicíny Ajurvédy. Pomocou širokého spektra pôsobenia umožňuje zásah do procesov vzniku AD. Kurkumín inhibuje tvorbu a podporuje dezagregáciu  $\beta$ -amyloidných plakov, zmierňuje hyperforforyláciu  $\tau$ -proteínu, inhibuje AChE, bráni mikrogliálnej zápalovej aktivite. Je potrebné zlepšiť jeho biologickú dostupnosť, aby sa úspech preklinických štúdií mohol previesť do klinických výsledkov<sup>24</sup>.

Kurkumín má však zanedbateľnú rozpustnosť vo vode, je rýchlo metabolizovaný a vylučovaný z obehového systému, dosahuje veľmi nízku koncentráciu v plazme. Významnou prekážkou je hematoencefalická bariéra pozostávajúca z tesne spojených endoteliálnych buniek, ktorá zabraňuje jeho prestupu do mozgu. Nanočasticové systémy predstavujú vhodnú voľbu na prekonanie týchto problémov. Ide predovšetkým o lipidové nanočastice, ktoré môžu kontrolovať uvoľňovanie látky a pôsobiť ako nosič pre ciele distribúciu, a tým zvýšiť dodanie kurkumínu do mozgu. Táto metóda sa javí ako nádejná a môže slúžiť ako nová terapeutická stratégia k aplikáciám kurkumínu pri liečbe porúch CNS<sup>25</sup>.

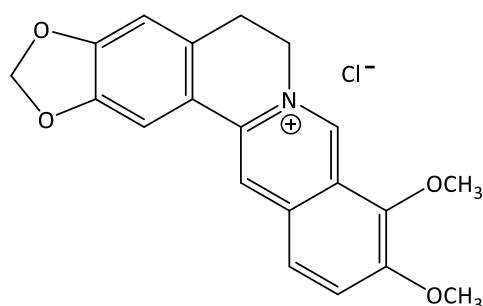


Obrázok 6 Kurkumín



## Berberín

Berberín, izochinolínový alkaloid nachádzajúci sa vo viacerých druhoch rastlín ako sú *Coptis sinensis* Franch. (Ranunculaceae), *Hydrastis canadensis* L. (Ranunculaceae), sa používa v čínskej a ajurvédскеj medicíne. Má niekoľko farmakologických aktivít, ktoré ho predurčujú ako prospešného pre AD. V patogenéze obmedzuje tvorbu extracelulárnych amyloidných plakov a intracelulárnych neurofibrilárnych spletí. Bol identifikovaný ako látka pôsobiaca zmiernenie oxidačného stresu a neuronálneho zápalu v mozgu. Existuje perspektíva, že berberín je pravdepodobne účinným potenciálnym terapeutickým prístupom v prevencii a oneskorení procesu vzniku AD<sup>26</sup>.



Obrázok 7 Berberín

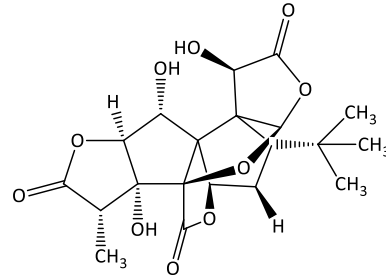
### 3.2.4 Látky iného pôsobenia

#### Extractum ginkgo bilobae

Extractum Ginkgo biloba EGb761, ktorý sa vyrába z listov stromu *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) obsahuje zmes viacerých aktívnych látok. Hlavnými nositeľmi rôznych farmakologických aktivít sú flavonové glykozidy (kvercetin, kempferol) a terpenové laktóny (ginkgolidy A, B, C a bilobalidy), ktoré pôsobia spolu s ďalšími látkami. Medzi hlavné účinky patria antioxidačný efekt vychytávaním voľných radikálov, ochranné pôsobenie na mitochondrie a s tým súvisiace ovplyvnenie bunkového energetického metabolizmu. Pôsobí aj na vaskulárne a reologické vlastnosti, inhibíciou faktora aktivujúceho krvné doštičky zlepšuje hemodynamiku a mikrocirkuláciu. Nepriamo znižuje tvorbu  $\beta$ -amyloidu a  $\beta$ -amyloidných fibríl, má neuroprotektívne účinky. Dochádza k zvýšeniu syntézy a uvoľňovania ACh a k zvýšeniu počtu nikotínových acetylcholínergých receptorov<sup>27</sup>.

EGb761 má dobrú biologickú dostupnosť v mozgu a vynikajúci bezpečnostný profil. Výsledky klinických štúdií u demencií vykazujú mierne až stredné zlepšenie

kognície a nekognitívnych symptómov demencie, preto je určený predovšetkým pre liečbu miernej kognitívnej poruchy, miernej demencie Alzheimerovho typu, vaskulárnych demencií a zmiešaných demencií. Používa sa tiež ako prídavná látka k inhibítorm AChE a k memantínu<sup>27</sup>.

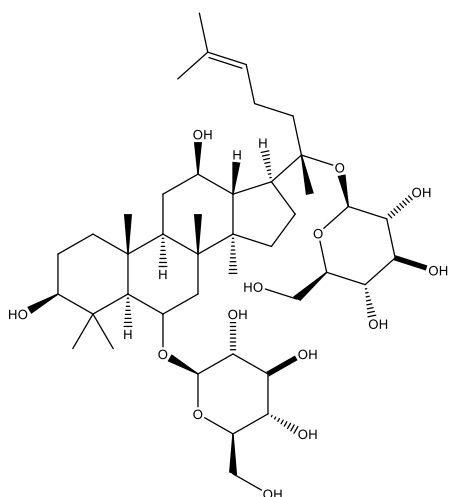


Obrázok 8 Ginkgolid B

### Ginsenosidy

Druh *Panax ginseng* C. A. Mey. (Araliaceae) poskytuje drogu Ginseng radix, ktorý sa využíva v tradičnej východnej medicíne a na organizmus pôsobí zvýšením fyzickej a psychickej odolnosti a odstránením únavy. Hlavnými farmakologicky aktívnymi látkami sú ginsenosidy, saponíny triterpenového typu. Pôsobia antioxidantne a protizápalovo. Chránia nervové bunky pred toxickým pôsobením  $\beta$ -amyloidu a znižujú jeho ukladanie v nervovom tkanive, zvyšujú expresiu ChAT a hladinu ACh, znižujú aktivitu AChE a zlepšujú kognitívne funkcie u pokusných zvierat, ako je pamäť a učenie<sup>28</sup>.

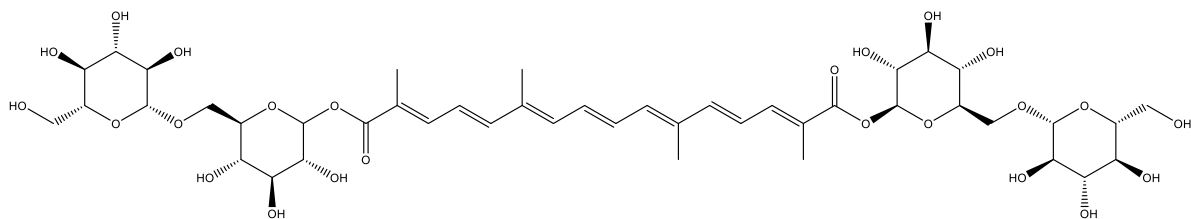
Neuroprotektívny účinok obsahových látok preukázal aj v niekoľkých klinických štúdiách pozitívny vplyv na kognitívne funkcie, pričom z tohto hľadiska sú najlepšie preskúmané ginsenosidy Rb<sub>1</sub> a Rg<sub>1</sub>. Predpokladá sa preto, že ginsenosidy by mohli nájsť uplatnenie pri liečbe neurodegeneratívnych ochorení, sú však potrebné ďalšie kvalitné a rozsiahlejšie štúdie, ktoré by tento priaznivý účinok overili<sup>28</sup>.



Obrázok 9 Ginsenozid Rg<sub>1</sub>

### Krocín

Hlavnú zložku suchej čnelky kvetu z rastliny *Crocus sativus* L. (Iridaceae) predstavuje krocín. Ide o vo vode rozpustný karotenoid, ktorý preukázal určitý potenciál v zlepšení učenia a pamäti. Krocín preukázal viacero aktivít ako je ochrana mozgových buniek, modulácia agregácie  $\beta$ -amyloidu a  $\tau$ -proteínu, zmiernenie kognitívnych a pamäťových porúch. Vykazoval tiež podporné účinky na zlepšenie depresie, úzkosti a oxidačného stresu, ktoré patria medzi časté príznaky u pacientov s AD. Javí sa ako perspektívna prírodná alternatíva v prevencii a liečbe AD, aj napriek obmedzenému počtu doposiaľ vykonaných klinických štúdií<sup>29</sup>.



Obrázok 10 Krocín

### 3.3 Popis rastlinných taxónov

#### 3.3.1 *Annona muricata* L.

Čeľad': Annonaceae



Obrázok 11 *Annona muricata* L.<sup>31</sup>

*Annona muricata* známa tiež ako graviola alebo guanabana pochádza z najteplejších tropických oblastí v Strednej a Južnej Amerike, Afrike a juhovýchodnej Ázii. Ide o vždyzelený strom dosahujúci výšku 4 až 8 m. Listy sú striedavé, na vetvách nápadne dvojrado usporiadané, kopijovité, lesklé, celistvookrajové, na vrchole zašpicatené. Kvetty vyrastajúce najčastejšie priamo z kmeňa sú tvorené žltavými okvetnými lístkami. Gyneceum tvorí väčší počet voľných plodolistov, ktoré sa pri dozrievaní menia na mechúriky, navzájom zrastajú a vytvárajú nepravý plod. Tento plod je jedlý, má nepravidelný srdcovitý tvar, je tmavozelený, na jeho povrchu sú mäkké ostne. Kôra, plody, semená a listy sa tradične používajú na zvládnutie mnohých chorôb ako je malária, cukrovka, parazitóza<sup>30,31</sup>.

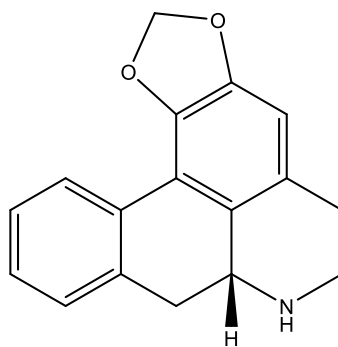
Fytochemické hodnotenia na rôznych častiach rastliny preukázali prítomnosť určitých rastlinných zložiek a zlúčenín. Z listov boli izolované alkaloidy, ktorých celkový obsah tvoril 0,125 %. Ide o aporfínové alkaloidy anonaín, izolaurelín, xylopín a benzyltetrahydroizochinolínový alkaloid koklaurín. Ďalej boli prítomné acetogeníny

(annonacín, izoannonacín, anomuricin A, anomuricin B, anomuricin C, anomutacín, annohexocín, muricatocín A, muricatocín B), flavonoidy (kvercetin, kempferol, katechín) a polyfenolické zlúčeniny (anoiond A, vomifoliol, rutin), silice ( $\delta$ -kadinen,  $\alpha$ -kadinol)<sup>32,33</sup>.

Vodný extrakt z listov a metanolový extrakt po podrobení fytochemickému skrínungu preukázali prítomnosť sekundárnych metabolitov ako sú alkaloidy, terpenoidy, flavonoidy, saponíny, taníny a glykozidy. Analýzou vodného extraktu listu bola zistená prítomnosť neenzymatických antioxidantných zložiek ako je vitamín C a E, ktoré udávajú listom významný antioxidantný potenciál využiteľný v prevencii neoplazmat<sup>34</sup>.

Acetogeníny vzbudzujú v posledných rokoch významný vedecký záujem, v dôsledku špeciálnej štruktúry a rozsiahlej biologickej aktivity. Z rastliny sa zvyčajne extrahujú použitím etanolu ako organického rozpúšťadla. Tieto zlúčeniny sú vysoko toxické pre nádorové bunky, pričom cytotoxicita je spôsobená depléciou hladín adenosíntrifosfátu (ATP) prostredníctvom ubichinón oxidoreduktázy. Predpokladá sa, že sú tiež neurotoxínmi, ktoré sú zodpovedné za vznik neurodegeneratívnych porúch vrátane atypického parkinsonizmu. Zlúčeniny spoločne vykazujú okrem protinádorových tiež parazitocídne, pesticídne a antimikrobiálne účinky<sup>32,35</sup>.

Boli vykonané *in vitro* štúdie zamerané na stanovenie antibakteriálnej, protiplesňovej a voľné radikály vychytávajúcej aktivity. Testovali sa hexanový, metanolový a etylacetátový extrakt z listov, pričom sa zistilo, že inhibujú rast baktérií a hub a vykazujú tiež antioxidantnú aktivitu vychytávaním radikálov pri rôznych koncentráciách jednotlivých extraktov. Tieto vlastnosti oprávňujú použitie extraktu pri liečbe rôznych bakteriálnych infekčných chorôb ako sú pneumónia, hnačka, infekcie močových ciest, kožné infekcie<sup>36</sup>.



Obrázok 12 Anonaín

### 3.3.2 *Leonotis leonurus* (L.) R. Br.

Čeľad': Lamiaceae



Obrázok 13 *Leonotis leonurus* (L.) R. Br.<sup>40</sup>

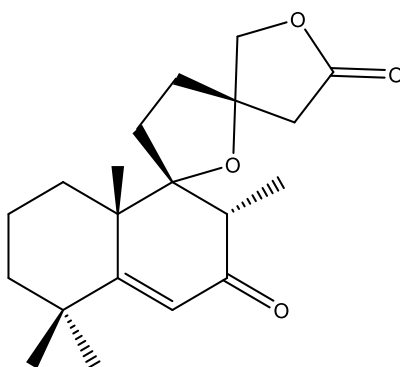
*Leonotis leonurus* je listnatý vždyzelený subtropický poloker pôvodom z južnej Afriky, známy svojimi liečivými a psychoaktívnymi vlastnosťami, hovorovo sa nazýva „wild dagga“ alebo tiež „levie ucho“. Je široko rozšírený na veľkej časti južnej Afriky vrátane východného a západného Kapska, provincií KwaZulu-Natal a Mpumalanga, ďalej v tropickej Ázii a južnej Indii. Rastie pozdĺž lesných okrajov najmä na brehoch riek, na skalnatých stanovištiach a trávnatých porastoch. Rastlina je ľahko kultivovateľná, odolná voči suchu, rýchlo rastúca, dosahujúca výšku 2 – 5 m a šírku 1,5 m. Základ rastliny tvorí zhrubnutá drevnatá vetvená byľ so svetlohnedou štvorhrannou stonkou a mladými nezrelými sivozelenými stonkami. Listy sú protistočné, stopkaté, podlhovasté so zúbkatým okrajom. Kvety sú oranžovej, marhuľovej alebo bielej farby, vyrastajú v zhlukoch. Plod je 2 mm tvrdka<sup>37,38</sup>.

Mnoho rokov sa využíva v tradičnej medicíne ako napríklad liek pri vysokom krvnom tlaku, kašli alebo bolesti hlavy. Listy a kvety rastliny sa tradične fajčia kvôli zmierneniu epilepsie a čiastočného ochrnutia<sup>37,38</sup>.

Hlavnými zloženinami nájdenými v rastline sú terpenoidy, najmä labdanové di-terpény (leoleorín A – J, leonurun, marubiín, premarubiín), monoterpény ( $\alpha$ -pinén, limonén,  $\beta$ -ocimén, p-cymén), seskviterpény ( $\beta$ -karyofylén, karyofylén oxid,  $\alpha$ -humulén). Fytochemické analýzy preukázali tiež prítomnosť trieslovín, alkaloidov (leonurín), steroidných a triterpenoidných saponínov, flavonoidov (luteolín, luteolín 7-O-glukozid, apigenín, vitexín), chinónov pri skúmaní etanolového, acetónového a vodného extraktu z rôznych častí rastliny<sup>39,40</sup>.

Biologické a farmakologické vlastnosti extraktov a izolovaných zlúčenín zahŕňajú antibakteriálnu, antifungálnu, antiprotozoálnu, enzýmy indukujúcu, protizápalovú aktivitu a moduláciu funkcie imunitných buniek. Vodnému extraktu z listov sa tiež pripisuje antikonvulzívna, antidiabetická, protizápalová, antioxidantná, anthelmintická aktivita<sup>40,41</sup>.

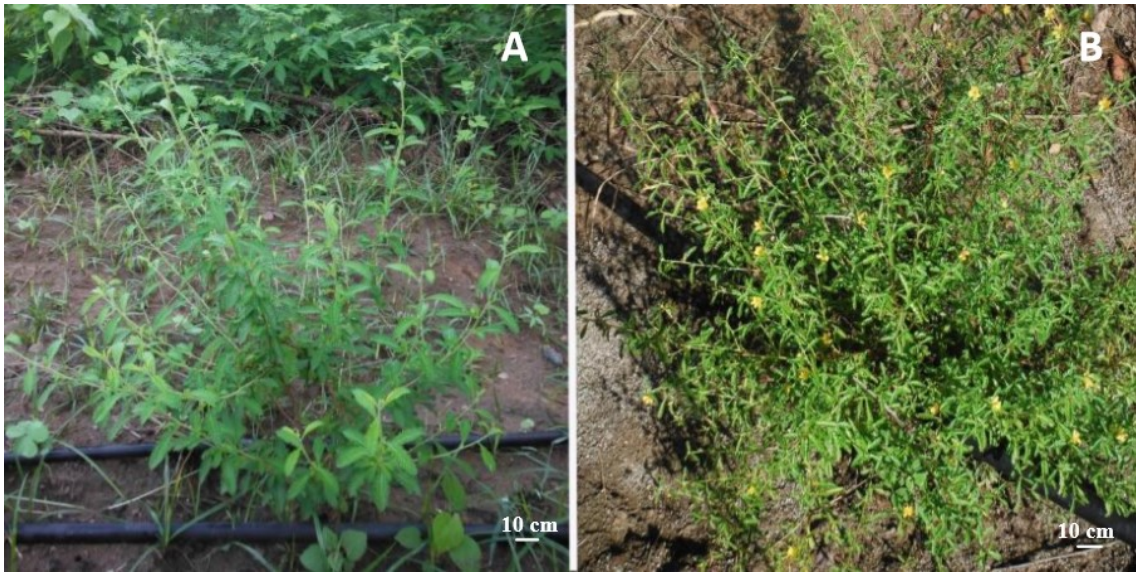
Extrakty z *Leonotis* vykazujú vplyv na CNS a ovplyvňujú rôzne procesy. Pri testovaní väzbovej afinity izolovaných zlúčenín na receptory v CNS niektoré zlúčeniny inhibovali väzbu ligandu na 5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>3</sub> serotonínové receptory, iné vykazovali aktivitu na D<sub>1</sub> dopamínovom a H<sub>1</sub> histamínovom receptore, pričom modulácia dopamínového systému je považovaná za dôvod upokojujúceho účinku dymu zo suchých listov. Leoleorín F a leoleorín C inhibovali väzbu na M<sub>3</sub> acetylcholínové a  $\sigma_1$  receptory. Etanolový extrakt listov vykazoval miernu inhibičnú aktivitu voči monoaminoxidáze (IC<sub>50</sub> = 63  $\mu$ g/ml) a vodný extrakt mal slabú neselektívnu a špecifickú inhibíciu monoaminoxidázy<sup>38,39</sup>.



Obrázok 14 Leoleorín G

### 3.3.3 *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

Čeľad': Passifloraceae



Obrázok 15 *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.<sup>42</sup>

*Turnera diffusa*, známa tiež ako damiána, je opadavý ker dorastajúci do výšky 30 cm až 2 m. Vyskytuje sa v suchých a polosuchých oblastiach západnej Indie, Južnej Ameriky, Mexiku a Spojených štátoch amerických. Oválno-kopijovité striedavé listy majú zubkatý okraj. Kvety sú malé 8 až 12 mm dlhé, tvorené piatimi žltými okvetnými lístkami, ktoré vyrastajú v pazuchách vrchných listov. Plodom je malá tobolka, ktorá meria asi 5 mm a pri dozrievaní uvoľňuje dve až štyri semená<sup>42</sup>.

V rôznych oblastiach sveta sa damiána používa na rôzne účely. Súhrne sa dá povedať, že je široko používaným tonickým a sexuálnym stimulantom s dlhou tradíciou v strednej Amerike, zatiaľ čo inde sa často považuje za účinnú proti chorobám žalúdka a cukrovky<sup>43</sup>.

Medzi hlavné bioaktívne zložky *Turnera diffusa* patria flavonoidy (apigenín 7-*O*-glukozid, luteolín 8-*C*-glukozid, diosmetín 8-*C*-glukozid, pinocembrín), fenoly, fenolové kyseliny a ich zlúčeniny (maltol 3-*O*-glukozid, arbutín), kyanogénne glukozidy (tetrafylín B), silice (1,8-cineol, oplopenon, kadalén, kubenol,  $\beta$ -karyofylén oxid, tymol), seskviterpenoidy (1-hydroxyeremofil-6,9-dien-8-ón a karyofylén epoxid), triterpenoidy (skvalén a  $\beta$ -sitosterol), polyterpenoidy (fikaprenol), mastné kyseliny, xantínové deriváty, sacharidy<sup>43,44</sup>.



Experimentálne údaje na podporu tradičného užívania tohto druhu vykazujú pozitívnu biologickú aktivitu, a to napríklad antianxietickú, antidiabetickú, afrodisiakálnu, gastroprotektívnu a hepatoprotektívnu. Neexistujú však žiadne dvojito zaslepené klinické štúdie na ľuďoch, ktoré by slúžili ako konečný dôkaz príslušnej biologickej aktivity. Jedinou publikovanou vedeckou štúdiou vykonanej na ľuďoch, je preukázanie pôsobenia damiány ako lieku proti obezite a ako výrobku na zvýšenie sexuálnej funkcie žien, kde však boli prítomné aj extrakty z iných rastlinných druhov<sup>44</sup>.

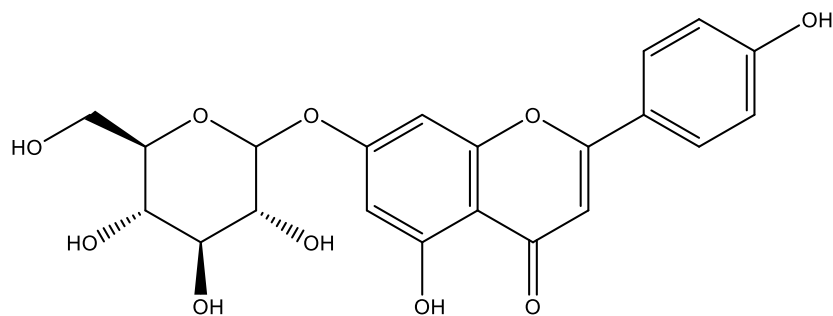
Liečivé druhy rastlín sú zdrojmi neuroaktívnych multi-target directed ligands (MTDLs). Aj v tomto prípade, bola snaha aplikovať extrakty a izolované zlúčeniny na prevenciu alebo aspoň oneskorenie progresie veľkej depresívnej poruchy a neurodegeneratívnych porúch ako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Bol preto skúmaný fenolický profil vodného extraktu z *Turnera diffusa* pomocou HPLC-DAD-ESI/ MS<sup>n</sup>, ktorý preukázal prítomnosť luteolín 8-*C*-glukozidu, luteolín 6-*C*-ketohekozidu, kvercetín 3-*O*-glukozidu, apigenín 7-*O*-glukozidu, derivátov luteolínu a vykazoval neuroaktívny potenciál inhibujúci MAO-A ( $IC_{50} = 129,80 \pm 11,97 \mu\text{g/ml}$ ), AChE a BuChE ( $IC_{25} = 0,352 \pm 0,011$  a  $0,370 \pm 0,036 \text{ mg/ml}$ ). Jeho inhibičná aktivita sa hodnotila proti ľudskej rekombinantnej MAO-A, AChE a BuChE. Bola sledovaná aj schopnosť extraktu pôsobiť proti toxicite indukovanej glutamátom použitím bunkovej línie ľudských neuroblastómov SH-SY5Y<sup>45</sup>.

Extrakt je tvorený bohatou zmesou flavonoidov a ich derivátov, predovšetkým derivátov luteolínu, ktorého C-glykozylácia zvyšuje antioxidačné, antialzheimerovské a antiflogistické pôsobenie. Flavonoidy patria medzi nádejné viaccieľové zlúčeniny a v súčasnosti sa používajú v terapii pri včasnom zvládaní neurodegeneratívnych porúch. Prispievajú k pozorovanej neuroaktivite, a to buď priamou inhibíciou CNS enzýmov alebo znížením intracelulárnej tvorby reaktívnych foriem SH-SY5Y<sup>45,46</sup>.

Monoaminoxidázy, ktoré taktiež zohrávajú úlohu v metabolizme neurotransmitérov, predstavujú zaujímavé miesta pôsobenia vo farmakologickej terapii. Selektívne inhibítory MAO-B sa používajú pri liečbe Parkinsonovej choroby a ako kombinačná liečba pri terapii AD. Flavonoidy ako významné sekundárne metabolity izolované z damiány boli hodnotené na inhibičnú aktivitu proti ľudským rekombinantným MAO-A a MAO-B, pričom akacetín 7-metyléter vykázal najsilnejšiu selektívnu inhibíciu voči enzýmu MAO-B<sup>47</sup>.

Pri testovaní cytotoxickej aktivity extraktov, frakcií a čistých zlúčenín z damiány proti bunkovým líniam mnohopočetného myelómu (NCI-H929, U266 a MM1S) sa zisti-

lo, že flavóny ako napríklad apigenín, chryzín a luteolín blokujú katalytickú aktivitu v nádorových bunkách a indukujú bunkovú smrť v bunkách myelómu. Naringenín a apigenín 7-*O*-glukozid vykazovali najvýznamnejšie cytotoxické účinky proti testovaným líniam<sup>48</sup>.



Obrázok 16 Apigenín 7-*O*-glukozid

### 3.3.4 *Hamelia patens* Jacq.

Čeľaď: Rubiaceae



Obrázok 17 *Hamelia patens* Jacq.<sup>49</sup>

*Hamelia patens* známa tiež ako „firebush“ alebo „scarlet bush“ je ker, ktorý zvyčajne dorastá do výšky 1,4 až 3 m. Jeho pôvodným výskytom sú stredoamerické a juhoamerické tropické oblasti od južnej Floridy cez Mexiko a Západoindické súostrovie po Brazíliu a Argentínu. Vetvičky sú oranžovo až fialovo sfarbené. Listy sú proti-stojné alebo praslenovité, kedy z jedného uzla stonky vyrastajú tri až štyri listy, sú jemne chlpaté až lysé. Stopka je 1 až 3,5 cm dlhá a čepeľ má vajcovitý až obráteno vajcovitý eliptický tvar s ostrým alebo špicatým vrcholom, je celistvookrajná. Kvetenstvom je vrcholičnatá lata s trubkovitými kvetmi, ktoré sú 1,2 až 2,2 cm dlhé, oranžovo až červeno sfarbené. Plodom je bobuľa, guľovitého alebo eliptického tvaru, v zrelosti červeno až čierne sfarbená<sup>50</sup>.

Fytochemické štúdie ukázali, že rastlina obsahuje flavonoidné glykozidy, naringin, kyselinu rozmarínovú a niekoľko alkaloidov ako sú pteropodín, izopteropodín, rumberín, palmirín, maruchín, ďalej alkaloidy – alkaloid A, tetrahydroalstonín, aricín, hamelín, uncarín, speciofylín, efedrín. Niektoré alkaloidy sú spájané s vplyvom na kontraktilitu myometria<sup>51</sup>.

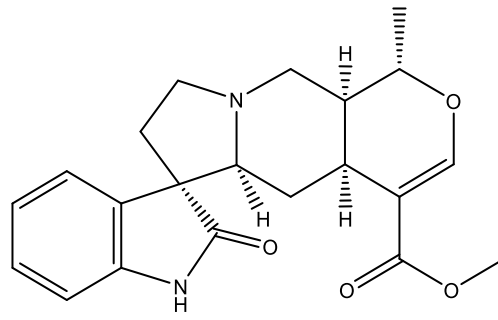
Pri skúmaní extraktov stoniek sa preukázala prítomnosť sterolov a triterpenoidov v petroléterovom extrakte a v chloroformovom extrakte prítomnosť alkaloidov, glykozidov, sterolov a triterpenoidov. Metanolový extrakt preukázal prítomnosť alkaloidov, sterolov, glykozidov, flavonoidov, trieslovín, proteínov a sacharidov<sup>52</sup>.

Rastliny sa používajú v ľudovom liečiteľstve proti rôznym chorobám. *Hamelia* sa používa v rastlinnej medicíne na liečbu atletickej nohy, kožných lézií a uštipnutie hmyzom, nervového šoku, reumatizmu, zápalu, bolesti hlavy, úplavice a astmy<sup>52</sup>.

Použitie rastliny v tradičnej medicíne oprávňuje práve prítomnosť polyfenolov, flavonoidov a alkaloidov, pričom najvyššia koncentrácia fenolových zlúčenín v extrakte sa získala pomocou rozpúšťadiel s vysokou polaritou. Vysoký obsah fenolových zlúčenín a významná lineárna korelácia medzi hodnotami koncentrácie fenolových zlúčenín a antioxidačnou aktivitou listov a stoniek naznačujú, že tieto zlúčeniny prispievajú k silnej antioxidačnej aktivite<sup>53</sup>.

Prírodné bioaktívne zlúčeniny, ako sú fenoly a flavonoidy sú veľmi dôležitými rastlinnými zložkami vykazujúcimi antioxidačnú aktivitu tým, že inaktivujú lipidové voľné radikály a bránia rozkladu prípadne prítomných hydroperoxidov na voľné radikály. Je známe, že fenolové zlúčeniny majú biologické vlastnosti ako napríklad antioxidačné, antikarcinogénne, chrániace pred kardiovaskulárnymi chorobami, imunitnými alebo autoimunitnými chorobami, dysfunkciou mozgu ako napríklad Parkinsonovou a Alzheimerovou chorobou<sup>52,53</sup>.

Metanolové extrakty z listov *Hamelia patens* boli testované na inhibíciu AChE, enzýmu získaného z mozgového homogenátu *Danio rerio*, sladkovodnej kaprovitej ryby. Hodnotenie aktivity AChE *in vitro* ukázalo, že metanolový extrakt z *Hamelia patens* znížil enzýmovú aktivitu. Po pridaní 0,5 ml extraktu sa zistilo, že enzymatická aktivita je 0,406  $\mu\text{mol}/\text{min}$  a pridanie 0,6 ml extraktu ukázalo enzymatickú aktivitu 0,184  $\mu\text{mol}/\text{min}$  oproti kontrole vykazujúcej 2,47  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Test *in vivo* taktiež ukázal, že rastlinný extrakt znižuje enzýmovú aktivitu. Po pridaní 0,3 ml extraktu bola hodnota aktivity 0,554  $\mu\text{mol}/\text{min}$  v porovnaní s kontrolnou hodnotou. Rastlina je preto potenciálnym zdrojom AChE inhibítorov, ktoré môžu byť použité na liečbu neurodegeneratívnych porúch. Vyžadujú sa však ďalšie štúdie na určenie konkrétnych zlúčenín, ktoré takú aktivitu vykazujú<sup>54</sup>.



Obrázok 18 Izopteropodín

### 3.3.5 *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel.

Čeľad': Rubiaceae



Obrázok 19 *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel.<sup>55</sup>

*Uncaria guianensis* bežne známy ako „garabato“ je endemický v amazónskych regiónoch Bolívie, Brazílie, Kolumbie, Ekvádoru, Guyany, Francúzskej Guyany, Peru, Suriname a Venezuele<sup>56</sup>. Rastlina, ktorá rastie ako šplhavá liana dorastá až do 10 metrovej dĺžky, na báze listov má tenké zahnuté tŕne viac ako 180°. Listová čepeľ je vajcovitého až eliptického tvaru, obojstranne lysá. Kvetenstvo dosahuje v priemere 1,4 – 3 cm, kvety uložené na stopkách majú lievikovitý kalich a korunu žlto sfarbenú, neskôr dočervena. Semená sú podlhovastého tvaru s krídlom<sup>57</sup>.

Používa sa v domorodých populáciách na liečbu astmy, artritídy, dermatitídy, cukrovky, gastritídy, zápalu urogenitálneho traktu, nádorov a vredov. Farmakologické štúdie potvrdili protinádorové, antidiabetické, antimikrobiálne, protizápalové, antioxidantné, antiparkinsonické a imunostimulačné účinky extraktov, pričom tieto vlastnosti sa pripisujú prítomnosti pentacyklických oxidolových derivátov, najmä mitrafylínu a izomitrafylínu<sup>56</sup>.

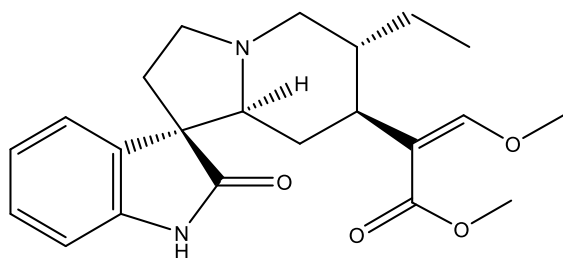
Pri skúmaní fytochemického zloženia rastlín rodu *Uncaria* sa zistilo, že medzi najvýznamnejšie zlúčeniny patria alkaloidy. Výnimkou nie je ani *Uncaria quianensis*,

ktorej hlavnými bioaktívnymi zložkami sú indolové alkaloidy. Tie sa ďalej klasifikujú ako tetracyklické oxidolové alkaloidy a pentacyklické oxidolové alkaloidy. Patrí tu napríklad rhynchofylín, rhynchofylín *N*-oxid, izorhynchofylín, izorhynchofylín *N*-oxid, mitrafylín, mitrafylín *N*-oxid, izomitrafylín, izomitrafylín *N*-oxid, angustolín, dihydrocorynanteín, hirsutín, pteropodín (uncarín C), izopteropodín (uncarín E)<sup>58</sup>. Izolovali sa aj iné zložky, a to pentacyklické triterpény ursanového typu, flavonoidy, fenoly, fenylpropanoidy<sup>59</sup>.

Uncarín C a E boli izolované z kôry *Uncaria guianensis* vrámci systematického hľadania potenciálnych protinádorových látok z rastlín. Uvádza sa, že obe zlúčeniny vykazujú slabú, ale reprodukovateľnú cytotoxicitu pre niekoľko bunkových línií a aktivitu pre RS322 a RS321 kvasinkových testov<sup>60</sup>.

Terapeutické účinky rastlín *Uncaria* na choroby centrálného nervového systému boli široko preštudované *in vitro* a *in vivo* metódami. Pri skúmaní pôsobenia extraktov proti AD sa zistilo, že izorhynchofylín môže zlepšovať deficit pamäti zlepšením antioxidantného a protizápalového účinku na mozgové tkanivá myši indukovaných D-galaktózou. Ako ďalší možný terapeutický prístup je modulácia neurotoxicity indukovanej  $\beta$ -amyloidným peptidom na zmiernenie nástupu a progresie AD, pričom sa zistilo, že alkaloidy rhynchofylín a izorhynchofylín majú ochrannú aktivitu proti neurónovej toxicite indukovanej  $\beta$ -amyloidmi, ktorá je výsledkom inhibície vnútrobunkového preťaženia vápnikom a fosforylácie  $\tau$ -proteínu<sup>59</sup>.

Pre zabezpečenie účinnosti a bezpečnosti pri klinickom použití je potrebný ďalší výskum biologických zlúčenín, farmakologických mechanizmov a toxicity rastlín rodu *Uncaria*<sup>59</sup>.



Obrázok 20 Rhynchofylín

### 3.3.6 *Allamanda cathartica* L.

Čeľad': Apocynaceae



Obrázok 21 *Allamanda cathartica* L.<sup>63</sup>

*Allamanda cathartica* známa aj ako „zlatá trúbka“ je drevnatý popínavý vždyzelený krík rastúci až do výšky 6 metrov, patriaci do čeľade Apocynaceae. Pôvodným výskytom sú tropické oblasti počínajúc Strednou Amerikou až po Brazíliu. Listy sú eliptické až obráteno vajcovité, protistočné alebo uložené v praslenoch. Kvety sú žltej farby s lievikovitým tvarom korunnej rúrky, päťpočetné, majú podobnú veľkosť ako listy. Plodom je tobolka s pichliačmi, semená sú okřídlené<sup>61,62</sup>. V tradičnej medicíne sa používa ako liečivá rastlina na uzdravenie rôznych chorôb, najmä žltacky a malárie, kvety sa používajú ako laxatívum<sup>62</sup>.

Početné fytochemické výskumy poukázali na prítomnosť sekundárnych metabolitov z extraktov listov, kvetov, stoniek, stonkovej kôry, koreňov a výhonkov. Príkladom sú fenoly (glabridín), flavonoidy (epikatechín, naringenín, kempferol), alkaloidy (chinolín-3-ylamín, heptandiamid), steroidy ( $\beta$ -sitosterol), terpény (skvalén, luteín,  $\beta$ -amyrín, vitamín E,  $\beta$ -karotén), laktóny (allamandín, plumericín, izoplumericín, acetylallamandín, allamandín, allamandicín), ako aj saponíny, antrachinóny, kumaríny<sup>61,63</sup>.

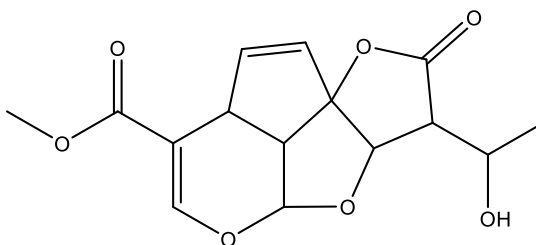


Rôzne štúdie potvrdili, že extrakty a účinné látky izolované z *Allamanda cathartica* vykazujú viaceré farmakologické účinky. Pri identifikácií terapeutického potenciálu boli odhalené analgetické, protizápalové, antidepresívne, antidiabetické, trombolytické, antihyperlipidemické, antimikrobiálne, antimalarické a antioxidantné vlastnosti, ďalej liečba neplodnosti a podpora hojenia rán<sup>63</sup>.

Rastlina slúži ako bohatý zdroj iridoidov izolovaných z koreňov, ktoré sú hlavným zdrojom sekundárnych metabolitov. Uvádza sa, že majú antileukemické a antivírusové vlastnosti. Okrem toho, listom a stonkám sa pripisujú adstringentné a antimikrobiálne účinky. *In vitro* štúdie podporili jeho použiteľnosť proti ľudským karcinómovým bunkám nosohltanu, zatiaľ čo *in vivo* štúdie etanolového extraktu z koreňa vykazovali aktivitu proti P-388 leukémii u myši<sup>64</sup>.

Pri skúmaní antimikrobiálneho potenciálu petroléterového, etylacetátového a metanolového extraktu koreňov testovaných *in vitro*, etylacetátový extrakt ukázal najširšie spektrum aktivity ako schopný inhibície gramnegatívnych a grampozitívnych organizmov použitých v štúdií. Metanolový extrakt tiež vykazoval silnú antibakteriálnu aktivitu. Tieto dva extrakty sa preukázali ako nositelia dobrých antibakteriálnych účinkov, môžu preto slúžiť na rozvoj nových antibakteriálnych látok<sup>65</sup>.

Výhodou väčšiny netoxických prírodných antioxidantov sú ich netoxické vlastnosti, lepšia tolerancia a bezpečnosť. Zistilo sa, že najvyššie hodnoty enzymatických antioxidantov ako sú peroxidáza, superoxid dismutáza, kataláza a celkový obsah fenolov boli pozorované v koreňoch oproti ostatným častiam rastliny. Vysoký antioxidantný potenciál koreňov *Allamanda cathartica* môže byť využitý pri liečbe rôznych chorôb, ktoré sprevádza oxidačný stres<sup>66</sup>.



Obrázok 22 Allamandicin

### 3.3.7 *Morinda citrifolia* L.

Čeľad': Rubiaceae



Obrázok 23 *Morinda citrifolia* L.<sup>70</sup>

*Morinda citrifolia* známa ako „Noni“ sú kríky alebo malé stromy široko rozšírené v tropickej a subtropickej oblasti Pacifiku. Ako jej pôvod sa uvádza tropická Ázia alebo Polynézia. Listy sú celistvookrajové, lesklé, protistočné, vajcovitého tvaru. Drobné biele kvety vytvárajú charakteristické súkvetie, hlávkú. Plodmi sú žlté kôstkovice tvoriace nepravý plod<sup>67,68</sup>.

Slúži ako jeden z najvýznamnejších zdrojov tradičnej medicíny pre miestnych obyvateľov. Šťava Noni môže pomôcť predchádzať zhubnému bujneniu a iným chorobám a udržiavať tak dobrý zdravotný stav. Korene, kôra, listy, kvety a plody sa tradične používajú v ľudovom liečiteľstve na liečbu chorôb ako je cukrovka, hypertenzia, nádorové ochorenie<sup>68</sup>.

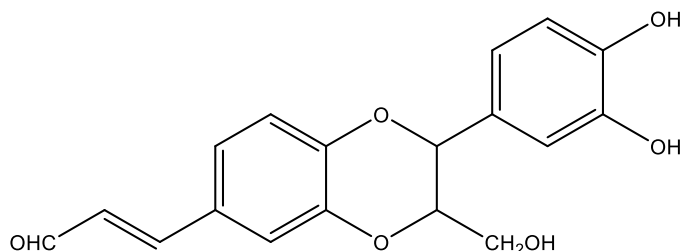
Rastlina obsahuje sekundárne metabolity, ktorým sa pripisujú antibakteriálne, antivírusové, protiplesňové, protinádorové, anthelmintické, analgetické, hypotenzívne, protizápalové a imunitu posilňujúce vlastnosti. Okrem ovplyvnenia celkového zdravia sa používa aj na prevenciu chorôb postihujúcich kožu, mozog, tráviaci trakt, srdce, pečeň<sup>69</sup>.

Fytochemické štúdie potvrdili obsah širokého spektra sekundárnych metabolitov. V listoch boli identifikované zlúčeniny ako sú flavonoidy (kvercetín), iridoidy (citrifolinozid B), lignany (amerikanín A), steroly ( $\beta$ -sitosterol), kumaríny (skopoletín),

triterpenoidy (ursolová kyselina). V rastlinách bola zistená aj prítomnosť alkaloidov, saponínov, fenolov, anthrachinónov, katechínov<sup>69,70</sup>.

V extrakte z listov *Morinda citrifolia* sa skúmali antileukemické mechanizmy na ľudských leukemických Jurkat bunkách a u leukémiou nakazených BALB/c myši. Extrakt štandardizovaný na (-)-epikatechín a skopoletín, v závislosti od dávky u myši, znižoval hladiny myeloblastov krvi a kostnej drene. Extrakt spôsobil apoptózu nádorových buniek, potlačenie zápalu a angiogenézy. Obsahové látky listov zmiernujú leukémiu vplyvom zmeny regulačných mechanizmov bunkového rastu v kostnej dreni a v obehovom systéme leukemických zvierat modifikovaním signálnych dráh<sup>71</sup>.

Pozorovania na skopolamínom navodeného poškodenia pamäti naznačujú, že extrakty plodov *Morinda citrifolia* môžu byť použité pri zlepšovaní pamäti. Merali sa účinky etanolového extraktu a jeho frakcií v koncentračnom rozmedzí 5 – 400 µg/ml pomocou *in vitro* testov vykonaných na homogenáte mozgu myši. Etanolový extrakt plodov a jeho etylacetátová frakcia obsahovali rutín, skopoletín a kvercetín, chloroformová frakcia obsahovala rutín a skopoletín. Tieto boli účinné pri amnézii navodenej skopolamínom, zatiaľ čo butanolová frakcia obsahujúca len rutín nemala žiadny účinok. Antiamnestický účinok extraktov sa dá pripísať prítomnosti rôznych fytozložiek s neuroprotektívnymi vlastnosťami. Zistila sa lineárna korelácia medzi koncentráciou aktívnych zložiek a efektom zlepšenia pamäti<sup>72</sup>.



Obrázok 24 Amerikanín A

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Všeobecné metódy

#### 4.1.1 Príprava a čistenie rozpúšťadiel

Všetky rozpúšťadla používané pre prípravu extraktov boli prečistené destiláciou komerčných rozpúšťadiel. Po zachytení a odstránení destilačného predku bola odobraná hlavná frakcia podľa tabelárne uvedenej teploty varu, ktorá predstavovala max. 90 % objemu rozpúšťadla. Čisté rozpúšťadla boli uchovávané v hnedých zásobných nádobách.

#### 4.1.2 Odparovanie rozpúšťadiel z extraktov a ich uchovávanie

Etanolové extrakty získané extrakciou vzoriek drog boli odparené pomocou rotačnej vakuovej odparky Büchi Rotavapor R-114 za zníženého tlaku (~ 10 mmHg) na vodnom kúpeli s teplotou do 40 °C do potrebnej konzistencie, ako je uvedené pri postupe analýzy extraktov.

Malé množstvá zahustených extraktov pre stanovenie biologickej aktivity boli prevedené Pasteurovou pipetou do injekčných ampuliek tak, aby sa výsledná hmotnosť odparku pohybovala v rozmedzí 3 – 8 mg u každého typu extraktu (sumárneho a etylacetátového). Tento zahustený extrakt bol odparený pri max. 50 °C na vodnom kúpeli v prúde dusíka. Úplné vysušenie týchto extraktov v ampulkách bolo vykonané vo vakuovom exikátore nad silikagélom (~ 10 mmHg) počas 24 hodín. Potom bol do ampuliek vpustený argón, ampulky zatavené a uchovávané do doby analýzy pri -22 °C.

### 4.2 Potreby

#### 4.2.1 Rozpúšťadla a chemikálie pre prípravu extraktov a detekciu na TLC

Acetanhydrid č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $C_4H_6O_3$ )

Amoniak 25% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $NH_4OH$ )

Dietyléter p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ( $Et_2O$ )

Dusičnan bizmutitý č. (Lach-Ner, Neratovice) ( $Bi(NO_3)_3$ )

Dusitan sodný č. (Lach-Ner, Neratovice) ( $NaNO_2$ )

Etanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) ( $EtOH$ )

Etylacetát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $EtOAc$ )

Fast Blue B (Lach-Ner, Neratovice)  
Hexakynoželezitan draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) ( $K_3FeCN_6$ )  
Hydroxid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KOH)  
Hydroxid sodný č. (Lach-Ner, Neratovice) (NaOH)  
Chlorid železitý bezvodý č. (Lach-Ner, Neratovice) ( $FeCl_3$ )  
Chloroform p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $CHCl_3$ )  
Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)  
Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)  
Kyselina mravčia 85% č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $HCOOH$ )  
Kyselina sírová 96% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $H_2SO_4$ )  
Kyselina sulfanilová p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ( $C_6H_7NO_3S$ )  
Kyselina trifluóroctová p. a. (Sigma-Aldrich, Praha) ( $CF_3COOH$ )  
Kyselina *p*-toluénsulfónová monohydrát č. (Ing. Švec – Penta, Praha)  
Kyselina vinná p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ( $C_4H_6O_6$ )  
Metanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)  
Metyletylketón č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $C_4H_8O$ )  
Síran sodný bezvodý č. (Lach-Ner, Neratovice) ( $Na_2SO_4$ )  
Toluén p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $C_6H_5CH_3$ )  
Vanilín č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $C_8H_8O_3$ )  
Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $Na_2CO_3$ )

#### 4.2.2 Chemikálie a materiál pre stanovenie cholinesterázovej aktivity

##### Chemikálie:

Acetyltiocholín jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)  
Butyryltiocholín jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)  
Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ( $KH_2PO_4$ )  
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha)  
( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ )  
Dimetylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Nemecko) (DMSO)  
5, 5'-Ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)  
Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ( $Na_2HPO_4$ )

### Reakčné roztoky:

Roztok 5mM DTNB: roztok bol pripravený priamym rozpustením naváženého množstva DTNB v takom množstve 100mM fosfátového pufru pH 7,4, aby vznikol 5mM roztok. Roztok je slabo žltej farby. Činidlo bolo uchovávané v chladničke pri 4 °C po dobu max. 1 týždňa.

Roztok 10mM ATChI: roztok bol pripravený rozpustením odpovedajúceho množstva látky vo vode, aby bola dosiahnutá koncentrácia 10 mM a roztok zostal číry. Činidlo bolo uchovávané v chladničke pri 4 °C po dobu max. 1 týždňa.

Roztok 10mM BuTChI: roztok bol pripravený rozpustením odpovedajúceho množstva látky vo vode, aby bola dosiahnutá koncentrácia 10 mM a roztok zostal číry. Činidlo bolo uchovávané v chladničke pri 4 °C po dobu max. 1 týždňa.

### Pufre:

100mM Fosfátový tlmivý roztok s pH 7,4 bol pripravený zmiešaním 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobný roztok A je 200mM roztokom  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 liter roztoku obsahuje 24,0 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Zásobný roztok B je 200mM roztokom  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 liter roztoku obsahuje 28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

### Biologický materiál:

Enzýmy boli pripravované rekombinantnou technológiou na Katedre chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Hradec Králové. Koncentrát enzýmov v tlmivom roztoku, ktorý bol uchovávaný pri -22 °C bol v čas potreby ponechaný na rozmrazenie v chladničke pri 4 °C a nariadený 100mM fosfátovým tlmivým roztokom s pH 7,4 tak, aby hodnota absorbancie bola pre AChE 0,08 – 0,15 a pre BuChE 0,15 – 0,20.

#### 4.2.3 Detekčné činidlá<sup>73</sup>

##### D 1 Amoniak

detekčné činidlo: pary 25% roztoku amoniaku

Suchý chromatogram sa pozoruje v ultrafialovom žiarení.

#### D 2 Diazoniové činidlo

detekčný roztok I: 0,5% vodný roztok soli Fast Blue B

detekčný roztok II: 0,1M roztok hydroxidu sodného

Najprv sa postrieka detekčným roztokom I, potom II.

#### D 3 Dragendorffovo činidlo

roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bizmutitého a 20,0 g kyseliny vinnej sa rozpustí v 80 ml vody

roztok B: 16 g jodidu draselného sa rozpustí v 40 ml vody

zásobný roztok: roztok A a roztok B sa zmiešajú v pomere 1:1

detekčný roztok: 5 ml zásobného roztoku sa pridá k roztoku 10 g kyseliny vinnej v 50 ml vody

#### D 4 Ferrikyanid draselný

roztok A: 1% vodný roztok hexakynoželezitanu draselného

roztok B: 15% roztok hydroxidu sodného

detekčný roztok: 1,5 ml roztoku A sa zmieša s 20 ml vody a pridá sa 10 ml roztoku B

Vysušený chromatogram sa deteguje v ultrafialovom žiarení.

#### D 5 Hydroxid draselný

detekčný roztok: 5% metanolový roztok hydroxidu draselného

Suchý chromatogram sa skontroluje v ultrafialovom žiarení.

#### D 6 Chlorid železitý

detekčný roztok: 1 – 5% roztok chloridu železitého v 0,5M kyseliny chlorovodíkovej

#### D 7 Liebermann-Burchardove činidlo

detekčný roztok: 5 ml acetanhydridu sa zmieša s 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a táto zmes sa pridá do 50 ml etanolu

Zahrieva sa 10 minút pri 100 °C. Fluorescenčné škvrny sa pozorujú pri UV žiarení.

#### D 8 Paulyho činidlo

detekčný roztok: 4,5 g sulfanilovej kyseliny sa rozpustí v 45 ml 12M kyseliny chlorovodíkovej a doriedi sa vodou do 500 ml; k 10 ml tohto roztoku sa pridá 10 ml 4,5%

vodného roztoku dusitanu sodného; výsledné činidlo sa uchováva 15 minút pri 0 °C a tesne pred použitím sa pridá rovnaký objem 10% vodného roztoku uhličitanu sodného

#### D 9 p-Toluénsulfónová kyselina

detekčný roztok: 20% roztok *p*-toluénsulfónovej kyseliny v chloroforme  
Zahrieva sa niekoľko minút pri 100 °C. Škvrnny fluoreskujú v UV žiarení.

#### D 10 Vanilín-sírová kyselina

detekčný roztok: k 100 ml 3% roztoku vanilínu sa pridá 3 ml 96% kyseliny sírovej  
Zahrieva sa 7 minút pri 110 °C.

#### 4.2.4 *Pomocné látky*

Kremelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich CZ)

Argón 5.0 (Linde Gas, Hradec Králové)

Dusík 5.0 (Linde Gas, Hradec Králové)

Filtračná tkanina vlizelín

#### 4.2.5 *Vyvíjacie sústavy pre TLC a chromatografické adsorbenty*

Vyvíjacie sústavy (pre TLC):

S<sub>1</sub>: chloroform+etylacetát+toluén+kyselina trifluoroctová (40:30:30:0,1)

S<sub>2</sub>: etylacetát+metyletylketón+kyselina mravčia+voda (10:7:2:1)

Chromatografické adsorbenty (pre TLC):

Komerčné dosky so silikagélom Merck: TLC Silikagél 60 F<sub>254</sub> (fa Merck)

#### 4.2.6 *Prístroje a ďalšie potreby*

Kúpeľ ultrazvukový Sonorex HP (Fisher Scientific, Pardubice)

Mikrodoštičky Nunc, 96jamkové, prírodné, dno U, nesterilné

Minitrepačka IKA MS3 (+ nástavec pre mikrodoštičky)

Mlynček IKA A10 (Fisher Scientific, Pardubice)

Odparka vakuová Büchi Rotavapor R-114

Pipeta nanášacia pre TLC kalibrovaná

Pipety automatické Eppendorf (Fisher Scientific, Pardubice)



Spektrofotometer Reader Bios II

Štatistický program GraphPad Software Prism7, San Diego, USA

Váhy analytické AET 100-5M (Fisher Scientific, Pardubice)

#### 4.2.7 Vzorky morfológických častí rastlín

Tabuľka 1 Pôvod použitých suchých morfológických častí rastlín

Č. vzorky	Taxón	Morfol. časť	Zdroj
AL-603	<i>Annona muricata</i> L.	list	Fy Petra Olivová, Lednice
AL-657	<i>Leonotis leonurus</i> (L.) R. Br.	vňat' v kvete	ZLR, Farm. fakulta UK, Hr. Králové
AL-670	<i>Turnera diffusa</i> Willd. Ex Schult.	vňat	Amazon.com (Amazon Herbs), USA
AL-671	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	vňat'	Amazon.com (Amazon Herbs), USA
AL-672	<i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F. Gmel.	kôra	Amazon.com (Amazon Herbs), USA
AL-673	<i>Allamanda cathartica</i> L.	koreň	Amazon.com (Amazon Herbs), USA
AL-676	<i>Morinda citrifolia</i> L.	list	Amazon.com (Amazon Herbs), USA

### 4.3 Príprava sumárneho a alkaloidného extraktu

#### 4.3.1 Príprava sumárneho (etanolového) extraktu

Suchá rastlinná časť bola rozomletá na časti s veľkosťou 1 – 2 mm. Do Erlenmayerovej banky bola vsypaná navážená rozomletá droga (5 – 10 g), ktorá bola preliatá 95% etanolom (w/v pomer 1 : 7 až max. 1 : 20 v prípade veľmi ľahkej drogy, inak podľa potreby) tak, aby droga bola celá ponorená a nad ňou boli aspoň 3 cm kvapaliny. Do banky bol vložený varný kamienok a droga bola podrobená varu pod spätným chladičom vo vodnom kúpeli 15 minút od okamihu začiatku varu. Po tejto dobe bola banka vybratá z vodného kúpeľa a ponechaná asi 15 minút schladnúť. Droga sedimentovala a tekutina bola prefiltrovaná cez filter z vlizelínu (filtrát nemusí byť číry). Toto vyvarenie bolo dvakrát opakované.

Následne bolo k usadenine v banke pridané také množstvo etanolu, aby táto usadenina bola práve prekrytá rozpúšťadlom. Zmes bola sonikovaná 10 minút pri normálnej teplote a stupni sonikácie 10 v ultrazvukovom kúpeli. Zmes bola opäť prefiltrovaná cez vlizelín ako v predchádzajúcich prípadoch. Spojené filtráty boli nakoniec sfiltrované cez vrstvu neutrálnej kremeliny (cca 5 – 10 cm) vo filtračnom tubuse. Číry filtrát bol zahustený asi na desatinu objemu. Do odváženej ampulky bolo Pasteurovou pipetou odobratého toľko roztoku, aby po odparení vážil odparok cca 3 – 8 mg (nutný len odhad). Po odparení boli ampulky s odparkami vysušené v exikátore (viď. všeobecné postupy).

Zvyšok, t. j. hlavná časť zahusteného etanolového extraktu v banke bola zahustená do riedkeho stavu, bolo pridaného cca 10 ml vody. Na odparke bol odparený zvyšok liehu. Vznikol viskózný extrakt, ktorý bol ďalej spracovaný. Tento typ extraktu sa označuje ako A (alkoholový extrakt).

#### 4.3.2 *Príprava alkaloidného (etylacetátového) extraktu*

Viskózný extrakt bol zmiešaný s 10 – 20 ml 2% HCl (podľa množstva odparku). Banka so suspenziou bola umiestnená do ultrazvukového kúpeľa a bola sonikovaná pri normálnej teplote a stupni sonikácie 10, pokiaľ bola vytvorená stabilná suspenzia (1 – 2 minúty). Táto suspenzia bola prefiltrovaná cez malý tubus a nízku vrstvu neutrálnej kremeliny (cca 5 mm). Banka bola vypláchnutá 10 ml vody, tento výplach bol sfiltrovaný cez rovnaký tubus a kyslé filtráty boli spojené.

Číry kyslý filtrát bol zriedený vodou na objem 40 – 50 ml a 2× vytrepaný  $\frac{1}{4}$  svojho objemu predestilovaným a nestabilizovaným éterom. Éterová vrstva s nečistotami bola po vytrepaní ostro oddelená a následne odstránená. Vodná kyslá vrstva bola zalkalizovaná 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  na pH cca 9 – 10 (univerzálny pH papierik) a vytrepaná  $3 \times \frac{1}{4}$  svojho objemu predestilovaným etylacetátom. Výtrepky boli spojené a v zabrusenej banke bolo k organickej vrstve pridané malé množstvo (2 – 5 g) bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  obsah banky bol pretrepaný a ponechaný sušiť cca 30 minút. Etylacetátová fáza bola sfiltrovaná vo filtračnom tubuse cez malú vrstvu celulózovej vaty a číry filtrát bol odparený za zníženej teploty a tlaku. Odparok bol zvážený a rozdelený do ampuliek po cca 5 mg, odparený a vysušený zvyčajným spôsobom. Tento typ extraktu sa označí ako E (etylacetátový).

#### 4.4 Kvalitatívna analýza oboch druhov extraktov na skupinové typy sekundárnych metabolitov (tenkovrstvová chromatografia)

Oba typy extraktov (sumárne, A a etylacetátové, E) boli podrobené tenkovrstvovej chromatografii na hlavné typy sekundárnych metabolitov, ktoré sú u jednotlivých taxónov uvádzané.

Tabuľka 2 Použité činidlá pre rámcovú detekciu sekundárnych metabolitov

Činidlo	Detekuje sekundárne metabolity
Amoniak	Flavonoidy, kumaríny
Diazoniové činidlo	Fenoly
Dragendorffove činidlo	Alkaloidy
Ferrikyanid draselný	Fenoly
Hydroxid draselný	Antrachinóny, kumaríny
Chlorid železitý	Fenoly, redukujúce látky
Liebermann-Burchardove činidlo	Steroidy, triterpény
Paulyho činidlo	Fenoly
<i>p</i> -Toluénsulfónová kyselina	Steroidy
Vanilín-sírová kyselina	Fenoly, flavonoidy, kumaríny, silice, steroidy

Analýza bola vykonávaná na komerčných doskách so silikagélom Merck: TLC Silikagél 60 F<sub>254</sub> (fa Merck) v sústavách S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> v nasýtených komorách, deliaca dráha 7,5 cm. Pre analýzu bol použitý 2% roztok suchých extraktov v 95% etanole, nanášanie bolo vykonané v prúžku dĺžky 1 cm a objemu 50 µl. Po nanosení roztoku vzorku bol prúžok vysušený v prúde vzduchu normálnej teploty a po niekoľkých minútach bola doska vyvinutá. Vyvíjanie v sústave S<sub>1</sub>: extrakt A – 95% EtOH vyvíjaný dvakrát a extrakt E – EtOAc vyvíjaný trikrát. Vyvíjanie v sústave S<sub>2</sub>: extrakt A – 95% EtOH vyvíjaný dvakrát a extrakt E – EtOAc vyvíjaný dvakrát.

Na dosky boli nanášané vzorky extraktov v tomto poradí:

1. AL-603 *Annona muricata* L.
2. AL-657 *Leonotis leonurus* (L.) R. Br.
3. AL-670 *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.
4. AL-671 *Hamelia patens* Jacq.
5. AL-672 *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel.
6. AL-673 *Allamanda cathartica* L.
7. AL-676 *Morinda citrifolia* L.

Po vybratí a úplnom vysušení adsorbentu na doske bola vykonaná najprv detekcia pod UV  $\lambda = 254$  a  $366$  a následne postrek jednotlivými činidlami.

#### 4.5 Stanovenie *hAChE* a *hBuChE* inhibície

IC<sub>50</sub> hodnota bola stanovená pomocou Ellmanovej spektrofotometrickej metódy s použitím 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (DTNB) pri  $\lambda = 412$  nm. Počas stanovenia bol sledovaný nárast absorbancie za 1 minútu. Hodnoty IC<sub>50</sub> boli vypočítané zo získaných hodnôt poklesu aktivity AChE alebo BuChE nelineárnou regresiou pomocou programu GraphPad Prism. Získané inhibičné aktivity IC<sub>50</sub> AChE a IC<sub>50</sub> BuChE pre jednotlivé látky boli porovnávané s inhibičnými aktivitami známych inhibítorov cholinesteráz – galantamínom (IC<sub>50</sub>, *hAChE* =  $1,710 \pm 0,065$   $\mu$ M; IC<sub>50</sub>, *hBuChE* =  $42,301 \pm 0,065$   $\mu$ M) a berberínom (IC<sub>50</sub>, *hAChE* =  $0,705 \pm 0,104$   $\mu$ M; IC<sub>50</sub>, *hBuChE* =  $30,721 \pm 3,492$   $\mu$ M). Inhibícia bola prepočítaná na percenta podľa vzorca:

$$\% I = 100 - (100 \times (\Delta A_{BL}) / (\Delta A_{SA}))$$

% *I* – percento inhibície;  $\Delta A_{BL}$  – pokles absorbancie slepej vzorky za 1 minútu;  $\Delta A_{SA}$  – absorbancia testovanej vzorky za 1 minútu.

Najskôr sa vykonalo screeningové meranie, pri ktorom boli všetky extrakty merané iba pri koncentráciách 2,0 mg/ml, t. j. 0,05 mg/ml koncentrácia v jamkách po pridaní činidiel pre meranie aktivity. V extraktoch, ktoré by vykazovali pri tejto koncentrácií inhibičný potenciál vyšší ako 50 % by bola stanovená IC<sub>50</sub>. V extraktoch, ktoré mali percentný inhibičný potenciál nižší ako 50 % sa nezistovala IC<sub>50</sub>, pretože tieto extrakty boli málo aktívne.

#### 4.5.1 Metodika predbežného testu

Do mikrotitračnej doštičky bolo súčasne vedľa seba do 3 jamiiek napipetovaného 8,3  $\mu$ l roztoku enzýmového preparátu a 283  $\mu$ l roztoku DTNB. Tento postup bol opakovaný do 2 rad pod sebou. Do prvej rady bolo napipetovaného 8,3  $\mu$ l roztoku extraktu s koncentráciou 2,0 mg/ml respektíve 0,05 mg/ml (koncentrácia v jamkách). Do druhej rady bol pridaný iba DMSO (8,3  $\mu$ l).

Doštička bola umiestnená do minitrepačky, kde počas 1 minúty prebehla homogenizácia. Potom bola inkubovaná v readeri po dobu 5 minút. Po vybratí bolo rýchlo do každej jamky pridaného 33,3  $\mu$ l roztoku substrátu (10mM ATChI alebo 10mM BuTChI). Doštička bola asi 10 sekúnd pretrepaná, vložená do prístroja a po 2 minútach pri  $\lambda = 412$  nm bola odčítaná inhibícia v percentách.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výsledky kvalitatívnej analýzy extraktov na skupinové typy sekundárnych metabolitov

Poradie nanášania extraktov:

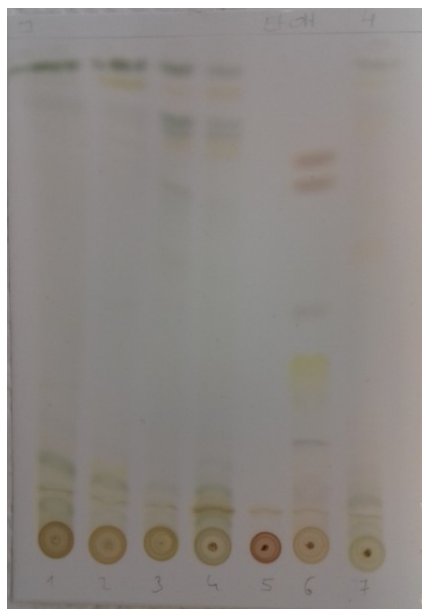
1. AL-603 *Annona muricata* L.
2. AL-657 *Leonotis leonurus* (L.) R. Br.
3. AL-670 *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.
4. AL-671 *Hamelia patens* Jacq.
5. AL-672 *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel.
6. AL-673 *Allamanda cathartica* L.
7. AL-676 *Morinda citrifolia* L.

Vyvíjacie sústavy pre TLC:

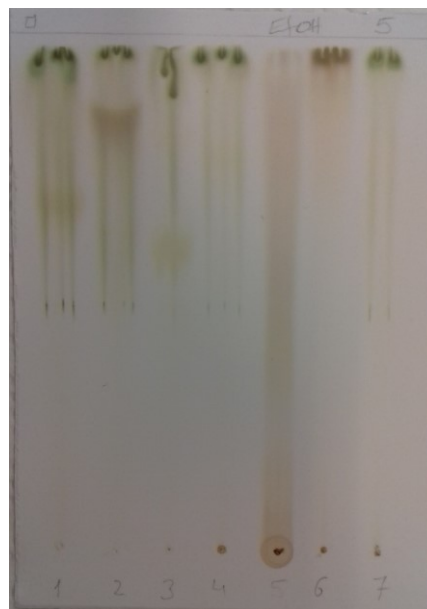
S<sub>1</sub>: chloroform+etylacetát+toluén+kyselina trifluoroctová (40:30:30:0,1)

S<sub>2</sub>: etylacetát+metyletylketón+kyselina mravčia+voda (10:7:2:1)

#### D 1 Amoniak

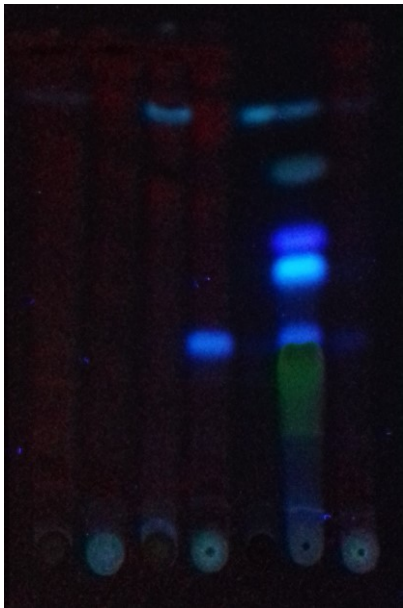


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

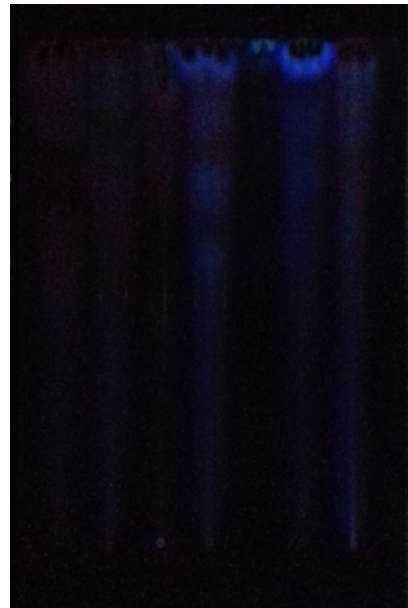


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

**D 1 Amoniak**

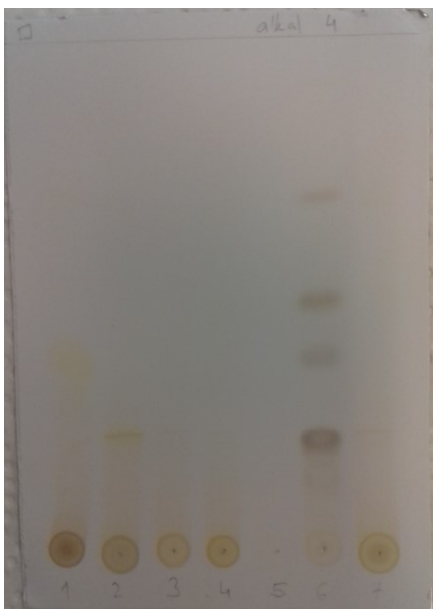


S<sub>1</sub> (ekstrakt A – 95% EtOH)



S<sub>2</sub> (ekstrakt A – 95% EtOH)

**D 1 Amoniak**

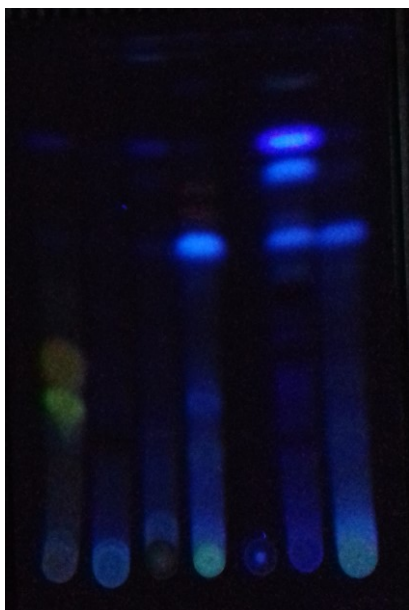


S<sub>1</sub> (ekstrakt E – EtOAc)

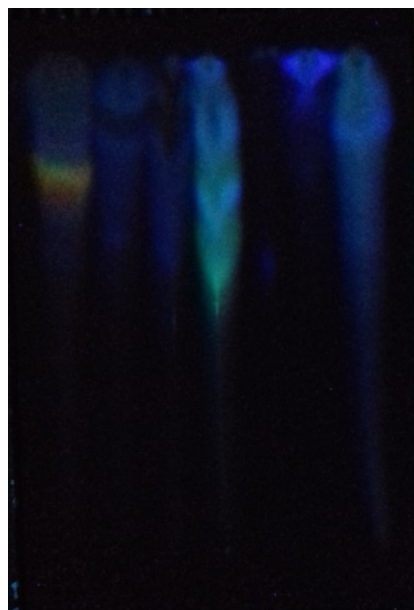


S<sub>2</sub> (ekstrakt E – EtOAc)

## D 1 Amoniak

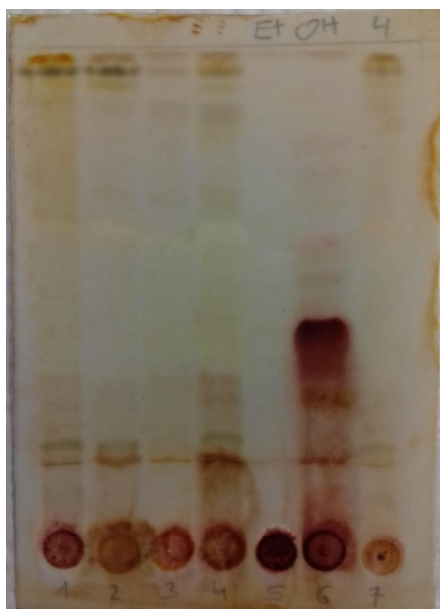


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

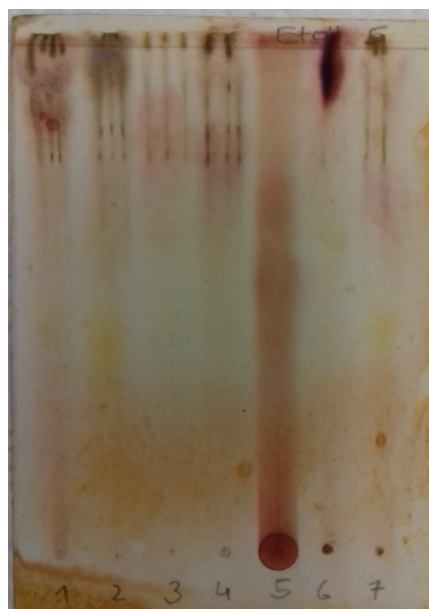


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

## D 2 Diazoniové činidlo



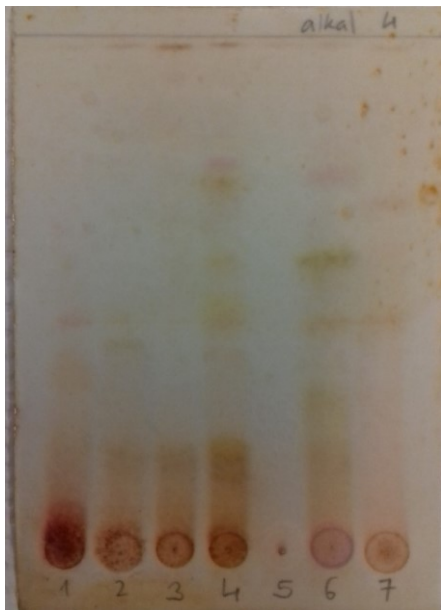
S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)



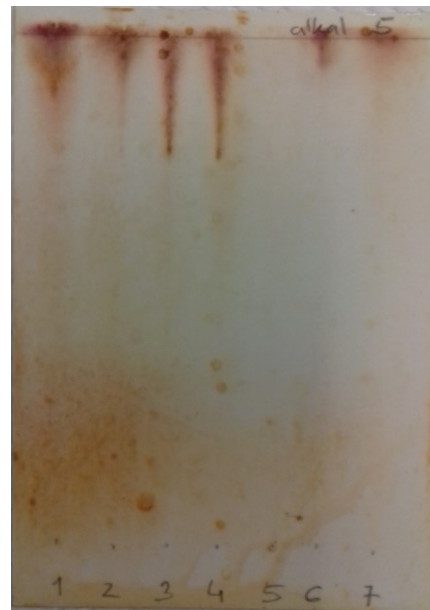
S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)



## D 2 Diazoniové činidlo

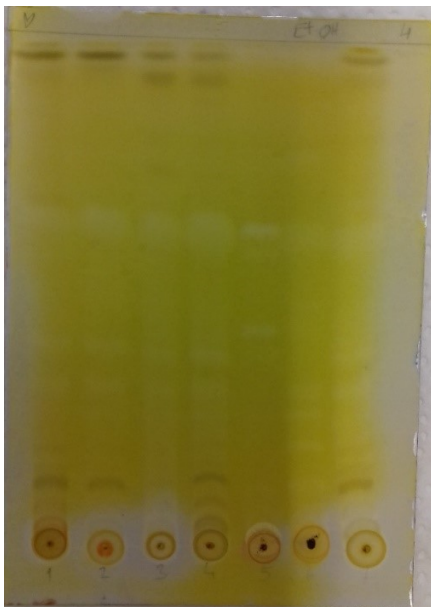


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

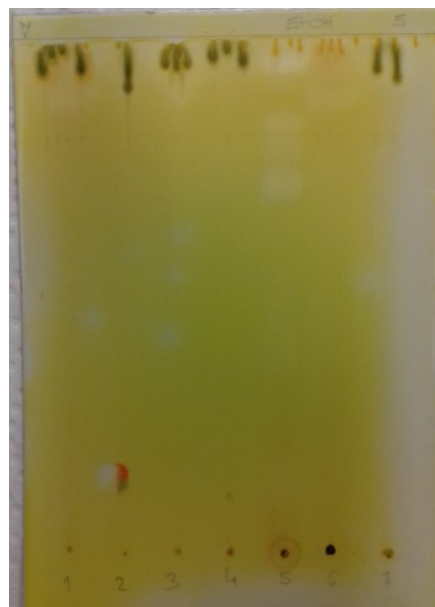


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

## D 3 Dragendorffovo činidlo

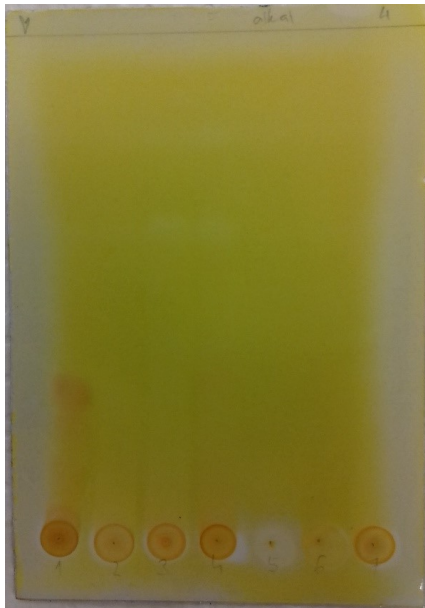


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

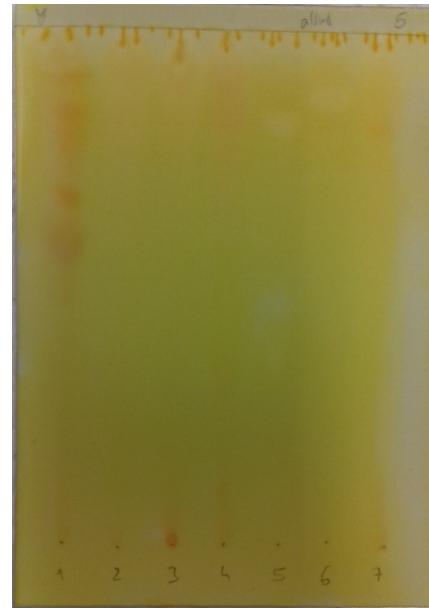


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

### D 3 Dragendorffovo činidlo

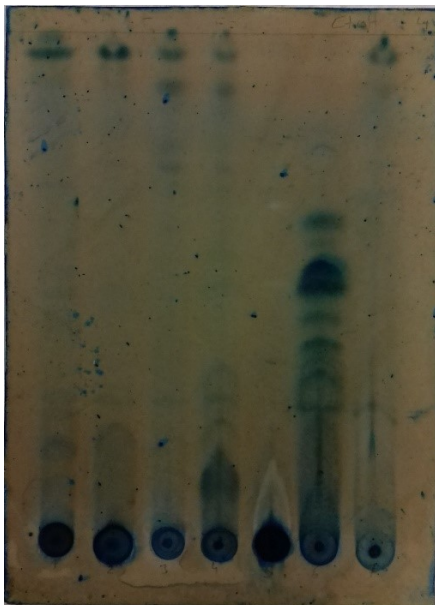


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

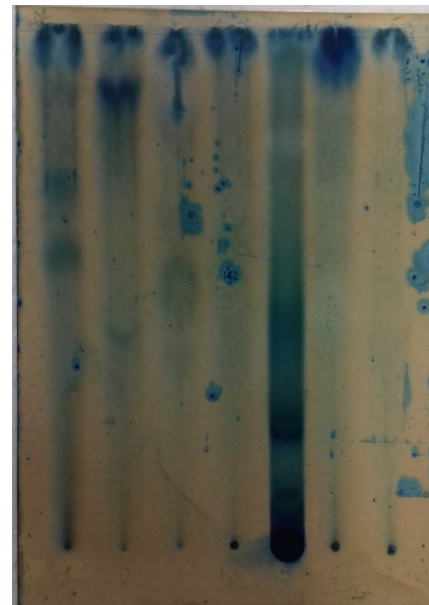


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

### D 4 Ferrikyanid draselný

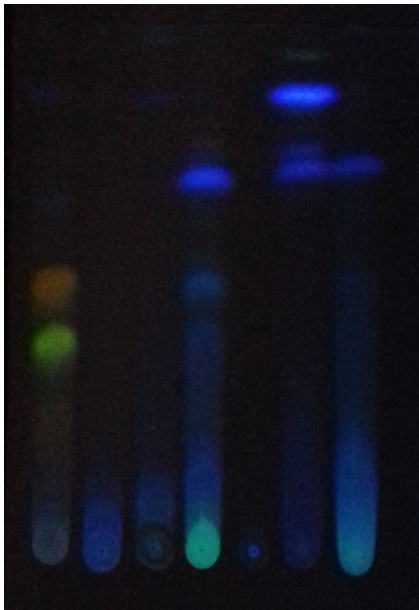


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

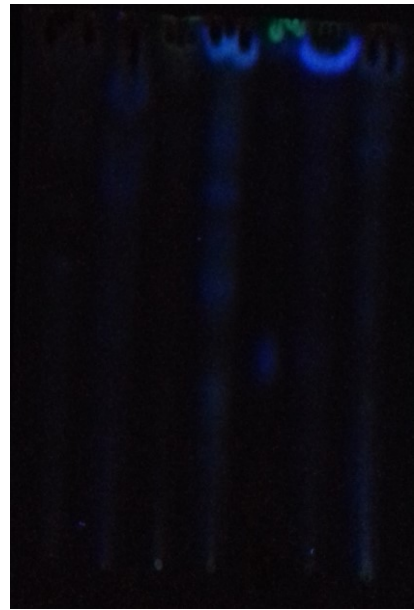


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

**D 4 Ferrikyanid draselný**

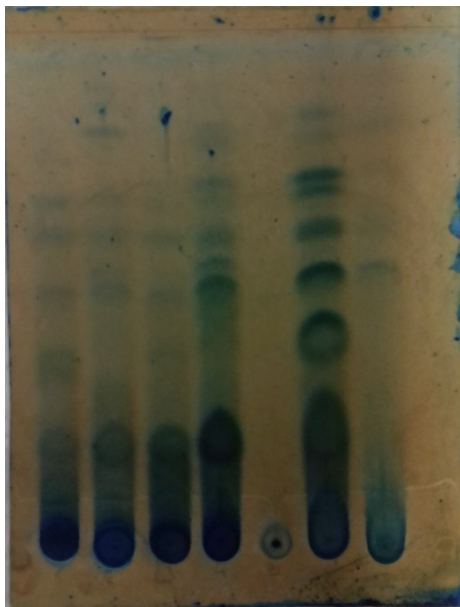


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

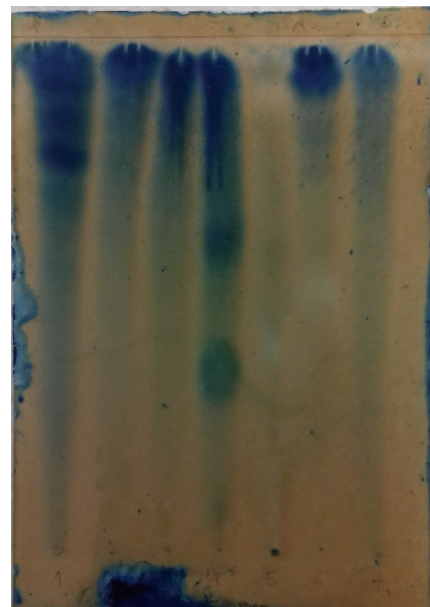


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

**D 4 Ferrikyanid draselný**

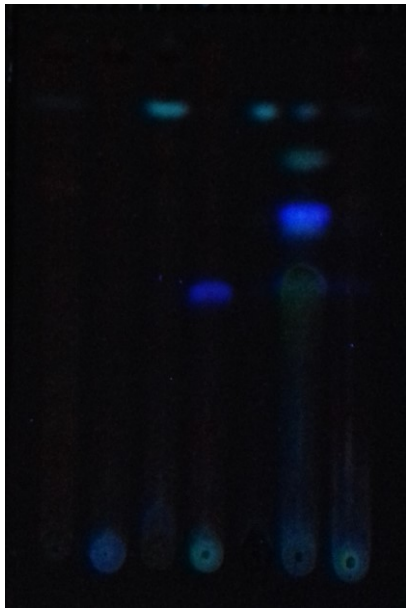


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

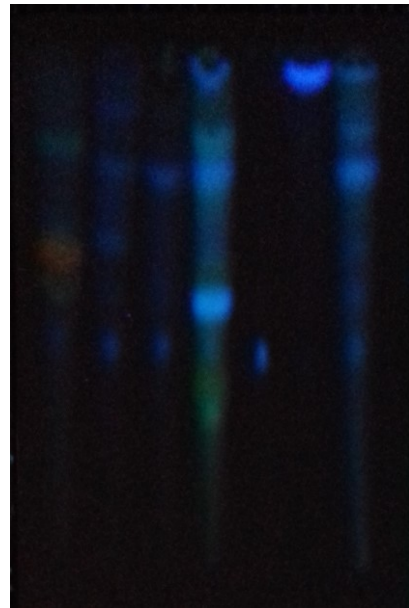


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

#### D 4 Ferrikyanid draselný

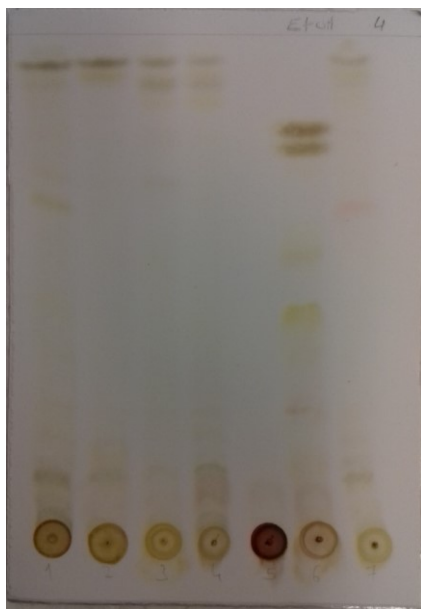


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

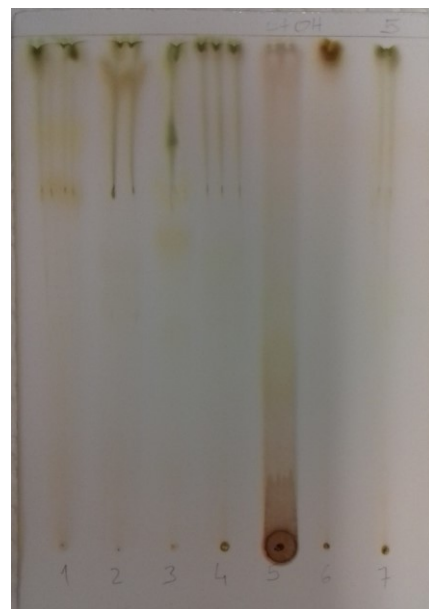


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

#### D 5 Hydroxid draselný

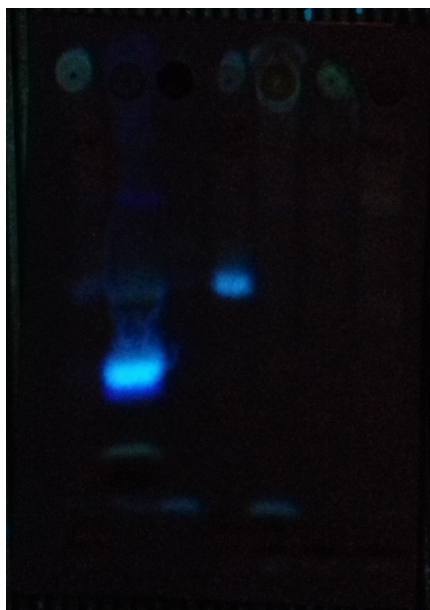


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

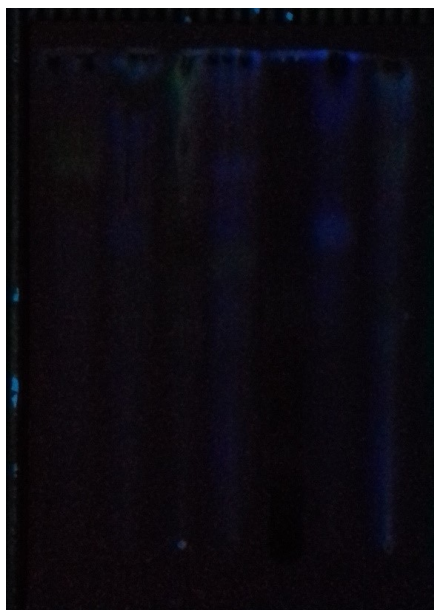


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

### D 5 Hydroxid draselný



S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)



S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

### D 5 Hydroxid draselný

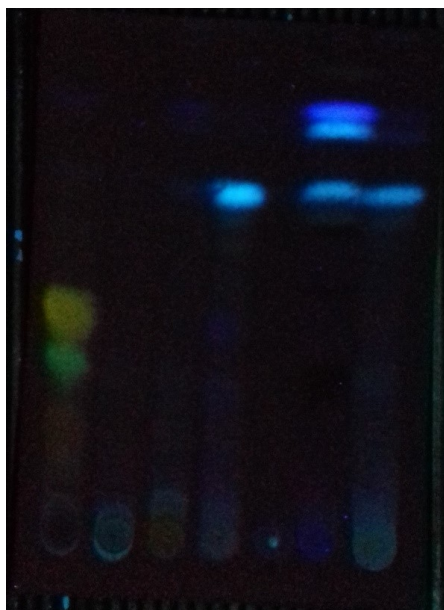


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

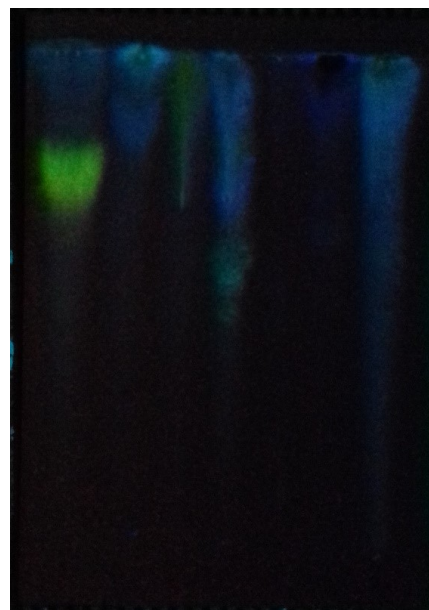


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

### D 5 Hydroxid draselný

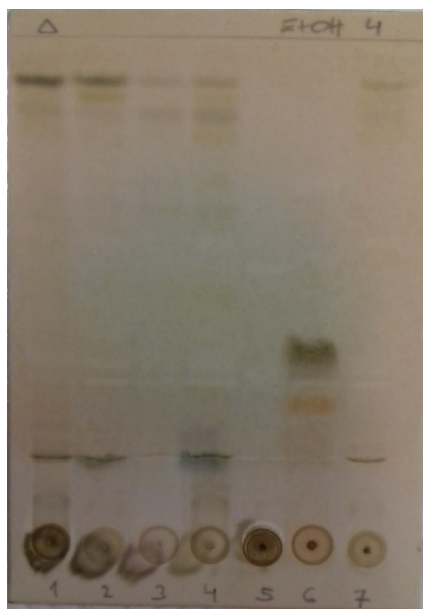


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)



S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

### D 6 Chlorid železitý



S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)



S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

## D 6 Chlorid železitý

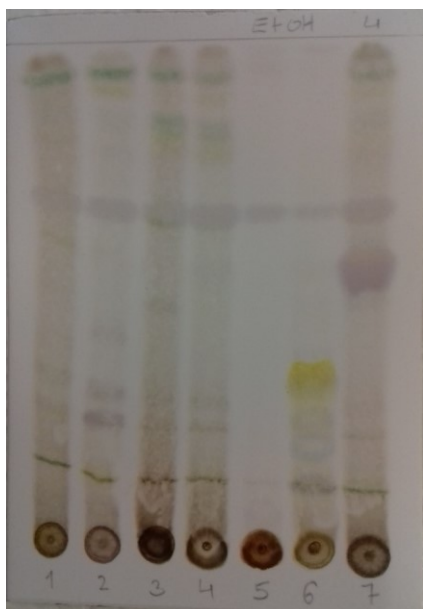


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)



S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

## D 7 Liebermann-Burchardove činidlo

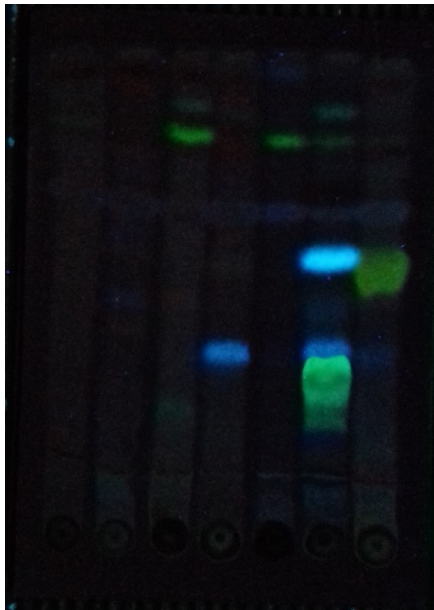


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

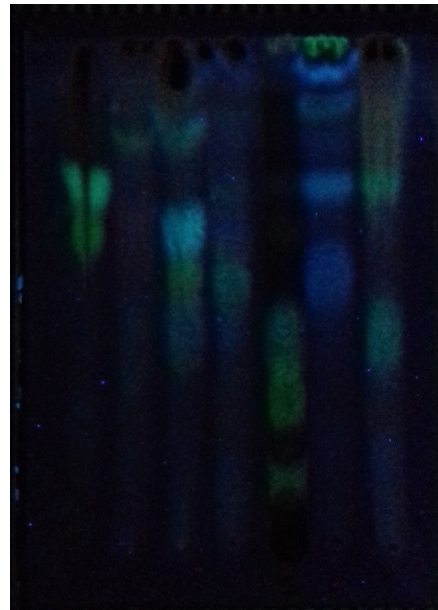


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

### D 7 Liebermann-Burchardove činidlo



S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

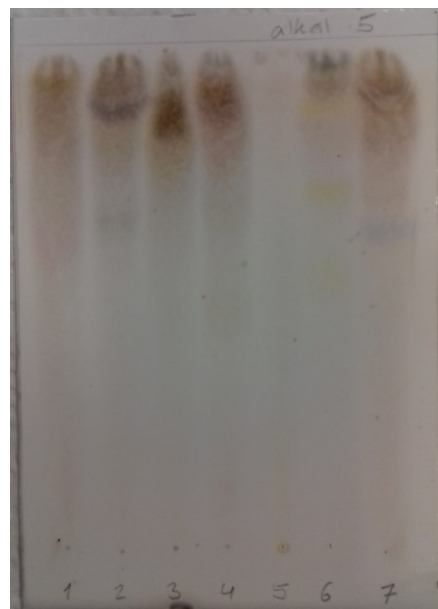


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

### D 7 Liebermann-Burchardove činidlo



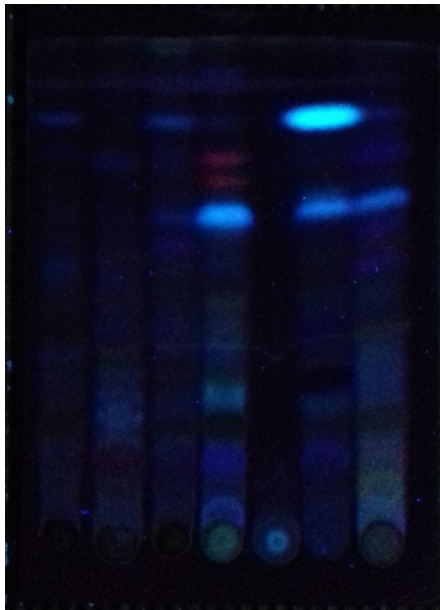
S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)



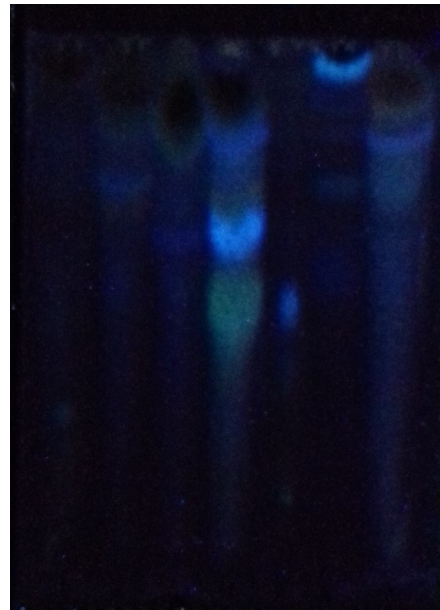
S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)



### D 7 Liebermann-Burchardove činidlo

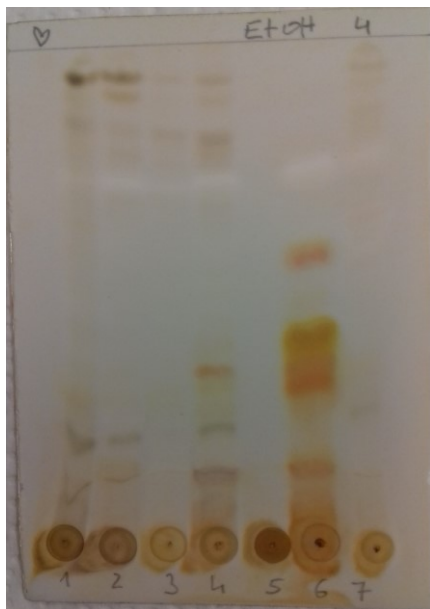


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)



S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

### D 8 Paulyho činidlo

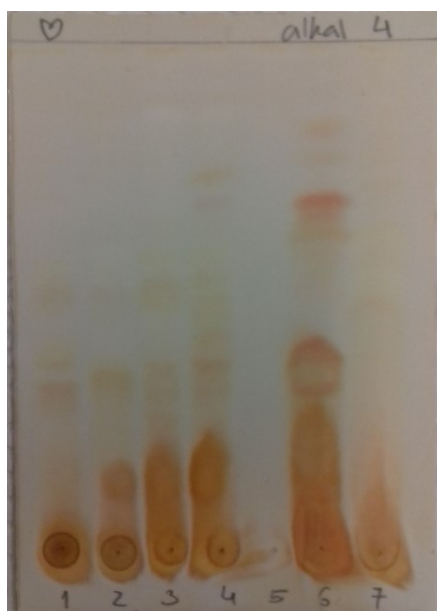


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

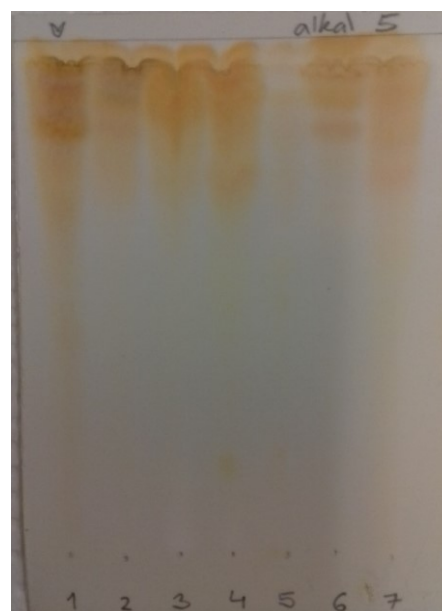


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

## D 8 Paulyho činidlo

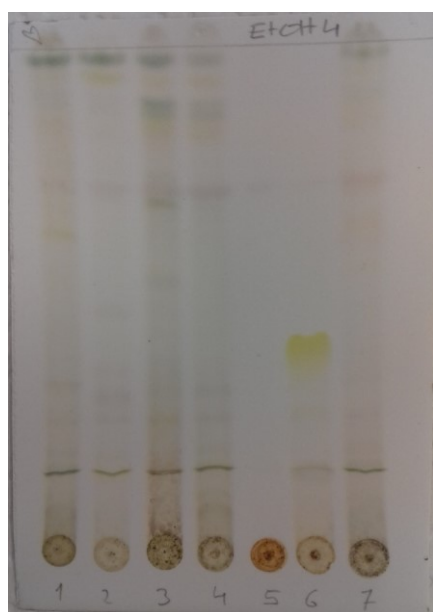


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

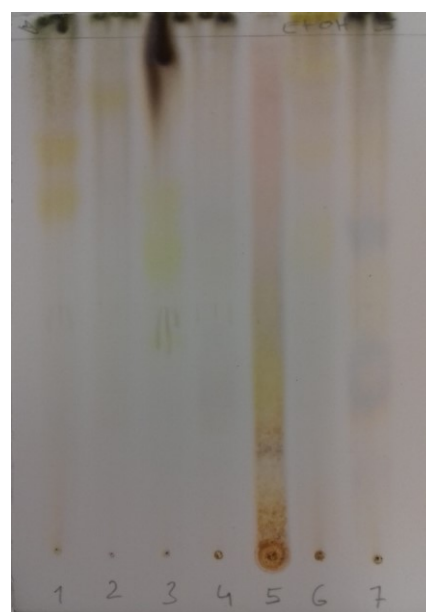


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

## D 9 *p*-Toluénsulfónová kyselina

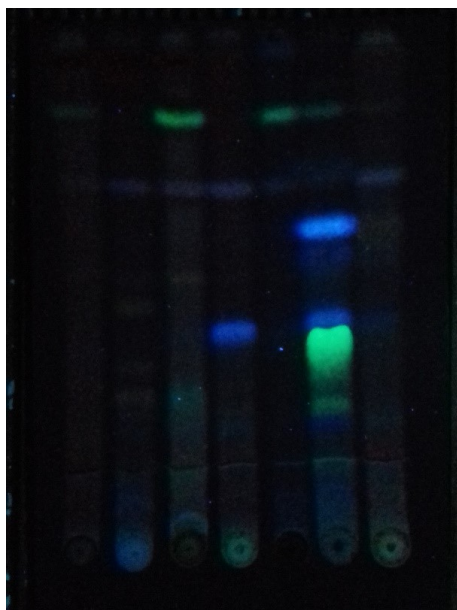


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

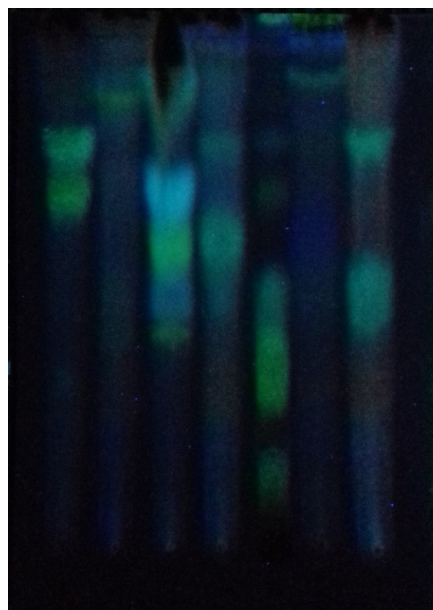


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

**D 9 *p*-Toluénsulfónová kyselina**



S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

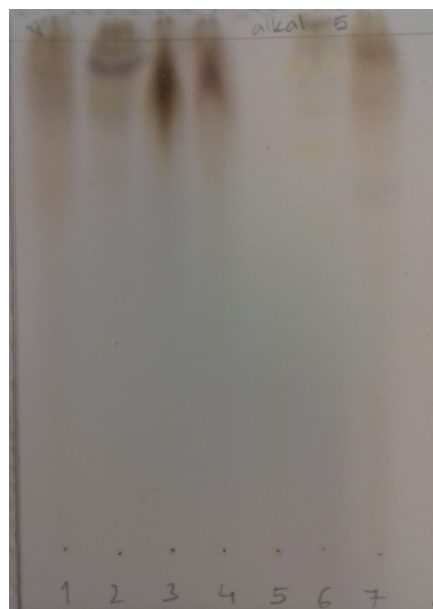


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

**D 9 *p*-Toluénsulfónová kyselina**

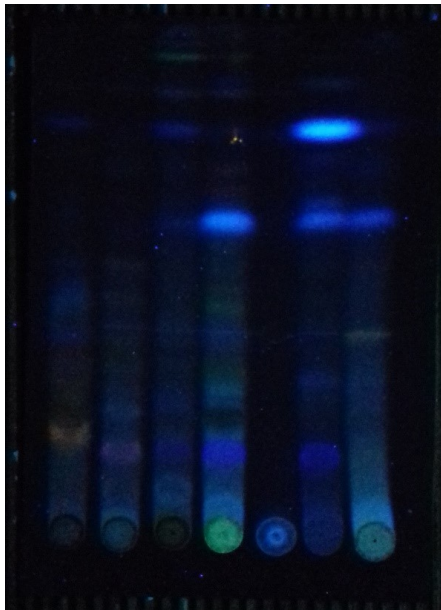


S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)

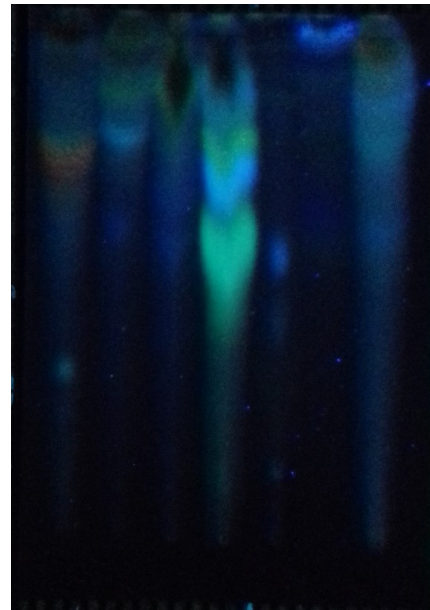


S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

### D 9 *p*-Toluénsulfónová kyselina



S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)



S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

### D 10 Vanilín-sírová kyselina

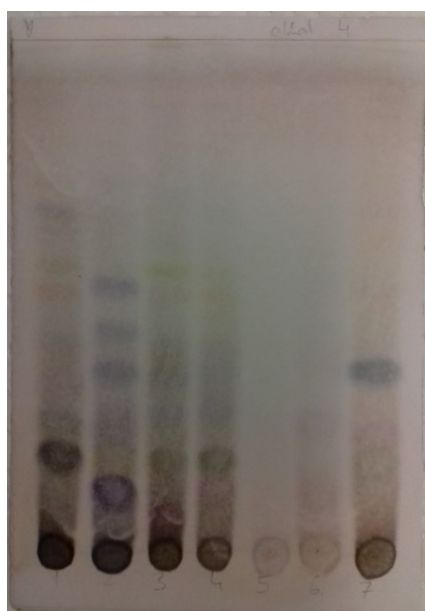


S<sub>1</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

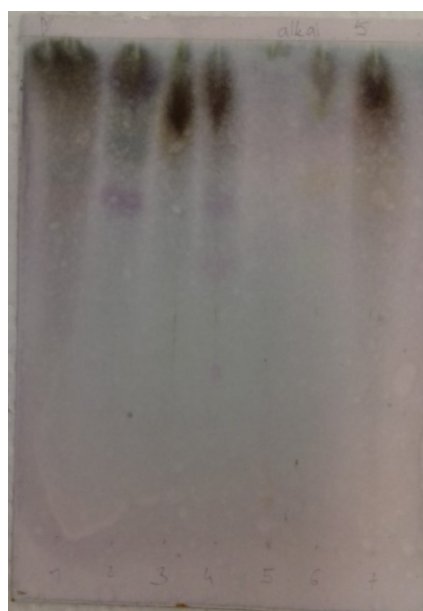


S<sub>2</sub> (extrakt A – 95% EtOH)

## D 10 Vanilín-sírová kyselina



S<sub>1</sub> (extrakt E – EtOAc)



S<sub>2</sub> (extrakt E – EtOAc)

## 5.2 Výsledky inhibičnej aktivity extraktov

Tabuľka 3 Výsledky inhibície

Typ extraktu*	Inhibícia <i>hAChE</i> ( $\Delta\%$ )	Inhibícia <i>hBuChE</i> ( $\Delta\%$ )
AL-670_E	9,95 $\pm$ 1,22	19,35 $\pm$ 1,74
AL-670_A	7,62 $\pm$ 1,41	7,40 $\pm$ 2,19
AL-671_E	8,80 $\pm$ 3,17	30,98 $\pm$ 2,47
AL-671_A	7,33 $\pm$ 1,51	11,63 $\pm$ 3,27
AL-672_E	7,29 $\pm$ 2,02	6,67 $\pm$ 1,34
AL-672_A	8,13 $\pm$ 1,56	16,39 $\pm$ 0,73
AL-603_E	9,40 $\pm$ 1,26	32,16 $\pm$ 0,66
AL-603_A	6,91 $\pm$ 0,89	10,63 $\pm$ 1,63
AL-657_E	11,77 $\pm$ 1,22	14,03 $\pm$ 2,40
AL-657_A	7,47 $\pm$ 0,77	3,04 $\pm$ 1,60
AL-673_E	7,50 $\pm$ 1,17	7,45 $\pm$ 1,10
AL-673_A	5,12 $\pm$ 1,50	9,30 $\pm$ 1,32
AL-676_E	11,05 $\pm$ 1,97	20,90 $\pm$ 1,85
AL-676_A	8,07 $\pm$ 0,90	7,75 $\pm$ 0,57

\* E – etylacetátový extrakt s prípadnými bázičnými látkami;

A – etanolový extrakt, sumárny, nečistený

## 6 DISKUSIA

Morfologické časti rastlín, študované v mojej diplomovej práci, pochádzajú z rastlín s obsahom biologicky aktívnych metabolitov, ktorých účinky by mohli byť prínosné. Bolo preto pristúpené k ich primárnemu štúdiu z hľadiska možného vplyvu na ľudské mozgové cholinesterázy (acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu). Nakoľko tieto rastliny nepochádzajú z európskej oblasti, ale z oblasti Ameriky a Ázie, bolo potrebné zaobstaráť sušené morfologické časti zo zahraničia. Pri tomto postupe sa však môže vyskytnúť určitý problém. Pokiaľ nezberáme rastliny sami v optimálnom období, aby sme presne poznali ich kvalitu, nemôžeme potvrdiť, ale ani vyvrátiť ich biologický účinok popisovaný v literatúre. Liečivé drogy síce boli analyzované z morfologického a mikroskopického hľadiska na Katedre farmaceutickej botaniky (porovnanie s položkami farmakognostického archívu vykonal prof. L. Opletal), pričom nebolo pozorované splesnivenie ani žiadne iné významné zmeny, avšak nie je možné vylúčiť nevhodnú dobu zberu a nevhodný spôsob skladovania, ktoré môžu mať vplyv na výsledky analýzy. Práve tieto dôvody môžu byť príčinou veľmi nízkej inhibičnej aktivity voči cholinesterázam.

Vo svojej práci som z každej rastlinnej vzorky pripravila dva typy extraktov, a to sumárny (etanolový) a alkaloidný (etylacetátový). Viedli ma k tomu informácie z literatúry, nakoľko rastliny pochádzajú prevažne z alkaloidných čeľadí Annonaceae<sup>74</sup> (*Annona muricata*), Passifloraceae<sup>75</sup> (*Turnera diffusa*), Rubiaceae<sup>76</sup> (*Hamelia patens*, *Uncaria guianensis*, *Morinda citrifolia*), Apocynaceae<sup>77</sup> (*Allamanda cathartica*) a z čeľade Lamiaceae<sup>78</sup> (*Leonotis leonurus*), ktorá do istej miery alkaloidy taktiež obsahuje. Predpokladala som, že v týchto druhoch budú alkaloidy prítomné, pretože v niektorých z nich už izolované a identifikované boli, ako uvádzam v Teoretickej časti (3.3). Tento predpoklad sa však naplnil len vo veľmi obmedzenej miere.

Pre analýzu sumárneho a alkaloidného extraktu pomocou tenkovrstvovej chromatografie na komerčných doskách (Silikagél Merck) som našla dve sústavy, ktoré považujem za najvhodnejšie, a to sústavu S<sub>1</sub> (chloroform+etylacetát+toluén+kyselina trifluóroctová v pomere 40:30:30:0,1) menej polárnu a S<sub>2</sub> (etylacetát+metyletylketón+kyselina mravčia+voda v pomere 10:7:2:1) polárnejšiu. Pre takú širokú skupinu látok, akú predstavujú metabolity zo 7 vzoriek rastlín s rôznym zastúpením sekundárnych metabolitov nebolo ľahké nájsť sústavy, ktoré by boli vhodné vo

všetkých prípadoch. Obe sústavy sú sústavy kyslé, S<sub>1</sub> s prídavkom trifluóroctovej kyseliny a S<sub>2</sub> s prídavkom kyseliny mravčej. Sústavy bázičné s dietylamínom alebo s amoniakom nebolo možné použiť z dôvodu nevyhovujúceho chromatografického delenia.

Detekcia Dragendorffovým činidlom v oboch sústavách ukázala, že v niektorých etylacetátových extraktoch sú prítomné v malom množstve alkaloidy, aj napriek tomu, že farebná reakcia s tetrajodobizmutitanom nebola výrazná. Významne sú alkaloidy prítomné len v *Annona muricata*, v ostatných prípadoch sú slabo viditeľné iba na štarte okrem *Hamelia patens*, kde sú pozorovateľné v poslednej tretine chromatogramu. Neočakávané je, že alkaloidy neboli detegované v rastline *Uncaria guianensis*, hoci literatúra uvádza bohaté zastúpenie oxindolových alkaloidov v rode *Uncaria*.<sup>79</sup>

Pre stanovenie inhibície boli použité oba ľudské rekombinantné enzýmy keďže výsledky lepšie odpovedajú skutočnosti ako v prípade enzýmov získavaných z krvi (erytrocytárna acetylcholinesteráza a sérová butyrylcholinesteráza). Pri štatistickom hodnotení je možné nájsť nižší rozptyl.

Pri vlastnom stanovení nebola meraná celá krivka (5 koncentrácií extraktu od 20 mg/ml do 0,002 mg/ml), ale bol vykonaný predbežný test, pri ktorom sa meria iba koncentrácia extraktu 2,0 mg/ml. Pokiaľ sa pri meraní tejto koncentrácie zistí pokles  $\Delta = 50\%$  a vyšší, má zmysel merať celú krivku a vypočítať IC<sub>50</sub>, pretože v takomto prípade je zrejmé, že v extraktoch budú prítomné výrazne aktívne látky. Avšak tento prípad nenastal ani v jednom z extraktov, ktoré som merala.

Pokles inhibície oboch enzýmov zisťovaný Ellmanovou metódou oproti kontrole sa vo všetkých rastlinných vzorkách pohyboval približne v rozmedzí 5 – 32 %. V prípade ľudskej acetylcholinesterázy bol vo všetkých vzorkách nevýznamný s hodnotami v rozmedzí 5 – 12 %. Výraznejší pokles bol len v prípade butyrylcholinesterázy, a to iba v alkaloidných extraktoch z *Hamelia patens* (AL-671\_E) 30,98 ± 2,47 % a *Annona muricata* (AL-603\_E) 32,16 ± 0,66 %. Pri rastline *Annona muricata* nie je toto zistenie prekvapivé, nakoľko u niektorých izochinolinových alkaloidov už bola táto aktivita voči BuChE popísaná.<sup>80</sup>

Inhibičná aktivita etylacetátového výtrepku z *Hamelia patens* môže byť spôsobená alkaloidmi (viď. Dragendorffove činidlo, S<sub>2</sub>, extrakt E), kde je pozorovateľná slabá koncentrácia týchto látok alebo inými látkami t. j. fenolickými látkami, triterpénmi, prípadne steroidmi (viď. detekcia ferrikyanidom draselným, Liebermann-Burchardovým činidlom, *p*-toluénsulfónovou kyselinou). Zo zvyšku sumárneho etanolového extraktu, ktorý som pôvodne pripravila, som sa pokúsila pripraviť etylacetátový extrakt, avšak



výtťažok tohto extraktu bol natoľko nízky, že nebolo možné vykonať delenie na minimálne 5 doskách Silikagélu Merck, aby bolo získané dostačujúce množstvo zón, v ktorých by bola stanovená inhibičná aktivita voči enzýmom.

V závere môžem konštatovať, že vzorky rastlinných častí neboli vo všetkých prípadoch v takom stave, aby podali po spracovaní reprezentatívnejšie výsledky. Výsledky mojej práce sa nezhodujú vo všetkých prípadoch s výsledkami literatúry, najmä pri rastline *Uncaria guianensis*, v ktorej neboli detegované alkaloidy v kôre. V prípade listov *Annona muricata* je inhibičná aktivita sčasti popísaná na acetylcholinesterázu komára *Aedes aegypti*<sup>81</sup>. Môžem tiež skonštatovať, že *Leonotis leonurus* neobsahuje alkaloidy, respektíve obsahové látky vňati neovplyvňujú cholinesterázy. Táto morfológická časť bola zbieraná z monokultúry na Zahradě léčivých rostlin FaF UK v dobe kvitnutia, citlivo sušená a skladovaná, preto považujem tento negatívny výsledok za odpovedajúci.

V prípade *Hamelia patens* literatúra uvádza, že ide o potenciálny zdroj inhibítorov acetylcholinesterázy, čo sa mi nepodarilo dokázať. Preukázala som však inhibíciu butyrylcholinesterázy, a preto si táto rastlina zaslúži pozornosť pre ďalšie štúdium.

# ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej botaniky

Kandidát: **Diana Karaščáková**

Školiteľ: **prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Názov diplomovej práce: **Biologická aktivita sekundárnych metabolitov rastlín XXX.; Základný screening vybraných taxónov na anticholinesterázovú aktivitu**

V rámci skúmania biologickej aktivity sekundárnych metabolitov bolo vybraných 7 taxónov vyšších rastlín. Štúdia sa zaoberá základným výskumom sumárnych a alkaloidných extraktov pripravených z morfológických častí rastlín *Annona muricata* (listy), *Leonotis leonurus* (vňat'), *Turnera diffusa* (vňat'), *Hamelia patens* (vňat'), *Uncaria guianensis* (kôra), *Allamanda cathartica* (koreň) a *Morinda citrifolia* (listy). Pre objasnenie zastúpenia hlavných typov sekundárnych metabolitov boli pripravené extrakty podrobené dôkazovým reakciám na TLC pomocou desiatich detekčných činidiel. Po detekcii Dragendorffovým činidlom etylacetátových extraktov boli alkaloidy vo významnejšej miere zastúpené iba v *Annona muricata*. Alkaloidy neboli detegované v kôre rastliny *Uncaria guianensis*.

Pomocou Ellmanovej metódy boli extrakty testované na potenciálnu inhibičnú aktivitu voči ľudským mozgovým cholinesterázam, pre stanovenie boli použité oba rekombinantné enzýmy. Ani v jednom z meraných extraktov neboli prítomné výrazne aktívne látky. Avšak najvýraznejšiu aktivitu voči butyrylcholinesteráze vykazoval alkaloidný extrakt z *Hamelia patens*  $\Delta = 30,98 \pm 2,47 \%$  a *Annona muricata*  $\Delta = 32,16 \pm 0,66 \%$ .

Na základe výsledkov sa ako perspektívna pre ďalšie štúdium javí *Hamelia patens*, ktorej inhibičná aktivita môže byť spôsobená jednak alkaloidmi a jednak inými látkami, medzi ktoré patria fenoly, triterpény a steroidy.

Kľúčové slová: *Annona muricata*, *Leonotis leonurus*, *Turnera diffusa*, *Hamelia patens*, *Uncaria guianensis*, *Allamanda cathartica*, *Morinda citrifolia*, inhibícia mozgových cholinesteráz, sekundárne metabolity

# ABSTRACT

**CHARLES UNIVERSITY**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Botany**

Candidate: **Diana Karašćáková**

Supervisor: **prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Title of diploma thesis: **Biological activity of plants secondary metabolites XXX.;**  
**Basic search of selected taxons on anticholinesterase activity**

As part of the study of the biological activity of secondary metabolites, 7 taxa of higher plants were selected. The study deals with basic research of summary and alkaloid extracts prepared from morphological parts of plants *Annona muricata* (leaves), *Leonotis leonurus* (perch), *Turnera diffusa* (perch), *Hamelia patens* (perch), *Uncaria guianensis* (bark), *Allamanda cathartica* (perch) and *Morinda citrifolia* (leaves). To elucidate the presence of the major types of secondary metabolites, extracts were prepared and subjected to detection reactions by TLC using ten detection reagents. After detection by Dragendorff's reagent of ethyl acetate extracts, alkaloids were significantly present only in *Annona muricata*. Alkaloids were not detected in the bark of *Uncaria guianensis*.

Using the Ellman method, the extracts were tested for potential inhibitory activity against human brain cholinesterases, using both recombinant enzymes. No significant active substances were present in any of the measured extracts. However, the most significant activity against butyrylcholinesterase was shown by the alkaloid extract from *Hamelia patens*  $\Delta = 30.98 \pm 2.47\%$  and *Annona muricata*  $\Delta = 32.16 \pm 0.66\%$ .

Based on the results, *Hamelia patens* appears to be promising for further study, whose inhibitory activity can be caused by alkaloids and other substances, including phenols, triterpenes and steroids.

Keywords: *Annona muricata*, *Leonotis leonurus*, *Turnera diffusa*, *Hamelia patens*, *Uncaria guianensis*, *Allamanda cathartica*, *Morinda citrifolia*, inhibition of brain cholinesterases, secondary metabolites

## 7 LITERATÚRA

---

- <sup>1</sup> Pidrman V.: *Demence*. Grada Publishing, Praha 2007.
- <sup>2</sup> Sheardová K., Hort J., Rusina R., Bartoš A., Línek V., Ressler P., Rektorová I.: Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurol. pro praxi* 10, 28 – 31 (2009).
- <sup>3</sup> Cahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: Natural Compounds (Small Molecules) as Potential and Real Drugs of Alzheimer's Disease: A Critical Review. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 42, 153 – 194 (2014).
- <sup>4</sup> Hosák L., Hrdlička M., Libiger J. a kol.: *Psychiatrie a pedopsychiatrie*. Karolinum, Praha 2015.
- <sup>5</sup> Kubešová H. M., Býma S.: *Demence-novelizace 2018*. Doporučené postupy pro praktické lékaře, CDP-PL, Praha 2 2018.
- <sup>6</sup> Fišar Z. a kol.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Grada Publishing, 2. vydání, Praha 2009.
- <sup>7</sup> Zvěřová M.: *Alzheimerova demence*. Grada Publishing, Praha 2017.
- <sup>8</sup> Holmerová I., Baumanová M., Jurašková B., Vaňková H., Jiráček R.: Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí. *Remedia* 6, 474 – 478 (2014).
- <sup>9</sup> Holmerová I., Baumanová M., Vaňková H., Jurašková B.: Možnosti farmakoterapie Alzheimerovy choroby a jiných onemocnění způsobujících demenci. *Psychiatrie pro praxi* 13, 64 – 68 (2012).
- <sup>10</sup> Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 5, 342 – 345 (2009).
- <sup>11</sup> Jiráček R.: Farmakoterapie demencí. *Praktické lékařství* 4, 286 – 290 (2008).
- <sup>12</sup> Jiráček R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi* 2, 101 – 105 (2002).
- <sup>13</sup> Švestka J.: Memantin- necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence. *Psychiatrie pro praxi* 3, 162 – 168 (2004).
- <sup>14</sup> Hung S.-Y., Fu W.-M.: Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* 24, (2017).
- <sup>15</sup> Vališ M., Kalnická D.: Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi* 12, 33 – 36 (2011).
- <sup>16</sup> Prokopová I.: Farmakoterapie Alzheimerovy demence a přidružených neuropsychiatrických symptomů- 2. část. *Psychiatrie pro praxi* 19, 58 – 63 (2018).

- 
- <sup>17</sup> Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., Havelek R.: The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Nat. Prod. Commun.* *11*, 1587 – 1594 (2016).
- <sup>18</sup> Jiráček R.: Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Čes. a slov. Psychiat.* *111*, 127 – 132 (2015).
- <sup>19</sup> Wollen K. A.: Alzheimer's Disease: The Pros and Cons of Pharmaceutical, Nutritional, Botanical, and Stimulatory Therapies, with a Discussion of Treatment Strategies from the Perspective of Patients and Practitioners. *Altern. Med. Rev.* *15*, 223 – 244 (2010).
- <sup>20</sup> Yang G., Wang Y., Tian J., Liu J.-P.: Huperzine A for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *PLoS One* *8*, (2013).
- <sup>21</sup> Choudhary M. I., Nawaz S. A., Haq Z., Azim M. K., Ghayur M. N., Lodhi M. A., Jalil S., Khalid A., Ahmed A., Rode B. M., Rahman A., Gilani A. H., Ahmad V. U.: Juliflorine: A potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *332*, 1171 – 1179 (2005).
- <sup>22</sup> Choudhary M. I., Yousuf S., Nawaz S. A., Ahmed S., Rahman A.: Cholinesterase Inhibiting Withanolides from *Withania somnifera*. *Chem. Pharm. Bull.* *52*, 1358 – 1361 (2004).
- <sup>23</sup> Newman D. J., Cragg G. M.: Advanced Preclinical and Clinical Trials of Natural Products and Related Compounds from Marine Sources. *Current Medicinal Chemistry* *11*, 1693 – 1713 (2004).
- <sup>24</sup> Tang M., Taghibiglou C.: The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* *58*, 1003 – 1016 (2017).
- <sup>25</sup> Malvajerd S. S., Azadi A., Izadi Z., Kurd M., Dara T., Dibaei M., Zadeh M. S., Javar H. A., Hamidi M.: Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. *ACS Chem. Neurosci.* *10*, 728 – 739 (2019).
- <sup>26</sup> Cai Z., Wang Ch., Yang W.: Role of berberine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* *12*, 2509 – 2520 (2016).
- <sup>27</sup> Jiráček R.: Extractum *Ginkgo biloba* EGb761 a jeho využití v psychiatrii. *Neurologie pro praxi* *19*, 15 – 18 (2018).

- 
- <sup>28</sup> Navrátilová Z., Patočka J.: Ženšen a jeho účinky na nervový systém. *Psychiatrie* 21, 126 – 133 (2017).
- <sup>29</sup> Finley J. W., Gau S.: A Perspective on *Crocus sativus* L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer's Disease. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1005 – 1020 (2017).
- <sup>30</sup> Chan W. J., McLachlan A. J., Hanrahan J. R., Harnett J. E.: The safety and tolerability of *Annona muricata* leaf extract: a systematic review. *J. Pharm. Pharmacol.* 72, 1 – 16 (2020).
- <sup>31</sup> *Annona muricata* L.-anona ostnitá, online cit. 2019-11-14. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/annona-muricata/>.
- <sup>32</sup> Moghadamtousi S. Z., Fadaeinasab M., Nikzad S., Mohan G., Ali H. M., Kadir H. A.: *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15625 – 15658 (2015).
- <sup>33</sup> Fofana S., Ziyayev R., Abdusamatov A., Zakirov S. Kh.: Alkaloids from *Annona muricata* leaves. *Chem. Nat. Compd.* 47, 321 (2011).
- <sup>34</sup> Chauhan A., Mittu B. a kol.: Phyto-Chemical Screening and Anti Listerial Activity of *Annona Muricata* (L) Leaf Extract. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 6, 269 (2015).
- <sup>35</sup> Vinothini R., Growther L.: Antimicrobial and Phytochemical Analysis of Methanolic and Aqueous Extract of *Annona muricata* (Leaf and Fruit). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5, 617 – 625 (2016).
- <sup>36</sup> Lawal Z. A., Hamid A. A., Shehu A., God'Shelf E., Ajibade O. S., Zubair O. A., Ogheneovo P., Mukadam A. A., Adebayo C. T.: Biochemical Properties, In-Vitro Antimicrobial, and Free Radical Scavenging Activities of the Leaves of *Annona muricata*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 21, 1197 – 1201 (2017).
- <sup>37</sup> Nsuala B. N., Kamatou G. P., Sandasi M., Enslin G., Viljoen A.: Variaton in essential oil composition of *Leonotis leonurus*, an important medicinal plant in South Africa. *Biochem. Syst. Ecol.* 70, 155 – 161 (2017).
- <sup>38</sup> Mazimba O.: *Leonotis leonurus*: A herbal medicine review. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 3, 74 – 82 (2015).
- <sup>39</sup> Wu H., Li J., Fronczek F. R., Ferreira D., Baurandt Ch. L., Setola V., Roth B. L., Zjawiony J. K.: Labdane Diterpenoids from *Leonotis leonurus*. *Phytochemistry (Elsevier)* 91, 229 – 235 (2013).

- 
- <sup>40</sup> Nsuala B. N., Enslin G., Viljoen A.: "Wild cannabis": A review of the traditional use and phytochemistry of *Leonotis leonurus*. *J. Ethnopharmacol.* *174*, 520 – 539 (2015).
- <sup>41</sup> Jimoh F. O., Adedapo A. A., Afolayan A. J.: Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonurus*. *Food Chem. Toxicol.* *48*, 964 – 971 (2010).
- <sup>42</sup> Baez-Parra K. M., Alcaraz-Melendez L., Santamaria-Miranda A., Heredia J. B., Leon-Felix J., Muy-Rangel M. D., Angulo-Escalante M. A.: Leaf morphology and anatomy of varieties of *Turnera diffusa* var. *Diffusa* and *Turnera diffusa* var. *Aphrodisiaca* (ward) urb. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* *15*, 110 – 116 (2018).
- <sup>43</sup> Tsaltaki C., Katsouli M., Kekes T., Chanioti S., Tzia C.: Comparison study for the recovery of bioactive compounds from *Tribulus terrestris*, *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Lepidium meyenii*, *Turnera diffusa* and *Withania somnifera* by using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extraction methods. *Ind. Crops Prod.* *142*, 111875 (2019).
- <sup>44</sup> Szewczyk K., Zidorn Ch.: Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana-*Turnera diffusa*. *J. Ethnopharmacol.* *152*, 424 – 443 (2014).
- <sup>45</sup> Bernardo J., Ferreres F., Gil-Izquierdo Á., Valentão P., Andrade P. B.: Medicinal species as MTDLs: *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult inhibits CNS enzymes and delays glutamate excitotoxicity in SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* *106*, 466 – 476 (2017).
- <sup>46</sup> Zhao J., Dasmahapatra A. K., Khan S. I., Khan I. A.: Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *J. Ethnopharmacol.* *120*, 387 – 393 (2008).
- <sup>47</sup> Chaurasiya N. D., Zhao J., Pandey P., Doerksen R. J., Muhammad I., Tekwani B. L.: Selective Inhibition of Human Monoamine Oxidase B by Acacetin 7-Methyl Ether Isolated from *Turnera diffusa* (Damiana). *Molecules* *24*, 810 (2019).
- <sup>48</sup> Willer J., Jöhrer K., Greil R., Zidorn Ch., Çiçek S. S.: Cytotoxic Properties of Damiana (*Turnera diffusa*) Extracts and Constituents and A Validated Quantitative UHPLC- DAD Assay. *Molecules* *24*, 855 (2019).
- <sup>49</sup> *Hamelia patens* Jacq., online cit. 2019-11-14. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/hamelia-patens/>.

- 
- <sup>50</sup> Ahmad A., Pandurangan A., Singh N., Ananad P.: A mini review on chemistry and biology of *Hamelia Patens* (Rubiaceae). *Pharmacogn. J.* *14*, 1 (2012).
- <sup>51</sup> Jiménez-Suárez V., Nieto-Camacho A., Jiménez-Estrada M., Sánchez B. A.: Anti-inflammatory, free radical scavenging and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Hamelia patens* and its chemical constituents. *Pharm. Biol.* *54*, 1822 – 1830 (2016).
- <sup>52</sup> Surana A. R., Kumbhare M. R., Wagh R. D.: Estimation of Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Assessment of in vitro Antioxidant Activity of Extracts of *Hamelia patens* Jacq. *Stems. Res. J. Phytochem.* *10*, 67 – 74 (2016).
- <sup>53</sup> Singh A., Vyas M.: Comparative in-vitro biological study of aerial parts of plant *Hamelia patens*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* *7*, 1793 – 1808 (2016).
- <sup>54</sup> Husna A., Bhavya M., Manjushree R., Sushmitha G. C., Jayanath A., Shadi M. J. H., Guruprasad R.: Inhibitor of acetylcholine esterase from *Hamelia patens* for Alzheimer's disease by using *Danio rerio* as a model organism. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* *5*, 701 – 709 (2016).
- <sup>55</sup> *Uncaria guianensis*- Wikipedia, online cit. 2020-02-23. Dostupné z: <https://goo.gl/images/7ezTTN>.
- <sup>56</sup> Honório I. C. G., Coppede J. S., Deprete P. G., Costa F. H. S., Telles M. P. C., Braga R. S., Diniz-Filho J. A. F., Correa V. S. C., França S. C., Pereira A. M. S., Bertoni B. W.: Genetic structure and chemical diversity in natural populations of *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. (Rubiaceae). *PLoS One* *13*, (2018).
- <sup>57</sup> Gattuso M., Di Sapio O., Gattuso S., Li Pereyca E.: Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. *Phytomedicine* *11*, 213 – 223 (2004).
- <sup>58</sup> Heitzman M. E., Neto C. C., Winiarz E., Vaisberg A. J., Hammond G. B.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* *66*, 5 – 29 (2005).
- <sup>59</sup> Zhang Q., Zhao J. J., Xu J., Feng F., Qu W.: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. *J. Ethnopharmacol.* *173*, 48 – 80 (2015).
- <sup>60</sup> Lee K. K., Zhou B., Kingston D. G. I., Vaisberg A. J., Hammond G. B.: Bioactive Indole Alkaloids from the Bark of *Uncaria guianensis*. *Planta Med.* *65*, 759 – 760 (1999).



- 
- <sup>61</sup> Fartyal M., Kumar P.: Evaluation of antimicrobial efficacy of alkaloids, flavonoids and steroids of *Allamanda cathartica* Linn. Against some pathogenic bacteria. *Int. J. Adv. Pharm., Biol. Chem.* 5, 303 – 313 (2016).
- <sup>62</sup> Wong S. K., Lim Y. Y., Chan E.: Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. *Pharmacogn. Commun.* 3, (2013).
- <sup>63</sup> Petricevich V. L., Abarca-Vargas R.: *Allamanda cathartica*: A Review of the Phytochemistry, Pharmacology, Toxicology, and Biotechnology. *Molecules* 24, (2019).
- <sup>64</sup> Khanam M. N., Anis M., Ahmad S.: Establishment of adventitious root cultures of *Allamanda cathartica* L. for the production of iridoid glycosides and its identification using HPTLC MS. *Ind. Crops Prod.* 125, 198 – 206 (2018).
- <sup>65</sup> Okwubie L., Chukwudi Senior Ch.: Evaluation of the antimicrobial activity of the crude root extracts of *Allamanda cathartica* L (Apocynaceae). *The Pharma Innovation Journal* 6, 88 – 92 (2017).
- <sup>66</sup> Hameed A., Nawaz G., Gulzar T.: Chemical composition, antioxidant activities and protein profiling of different parts of *Allamanda cathartica*. *Nat. Prod. Res.* 28, 2066 – 2071 (2014).
- <sup>67</sup> Jahodář L.: *Farmakobotanika*, str. 137. Karolinum, Praha 2006.
- <sup>68</sup> Mathew S., Britto S. J.: Anatomical Profile of Four Valuable Medicinal Plants of Family Rubiaceae. *Int. J. Pharm. Pharm. Res.* 6, 202 – 209 (2016).
- <sup>69</sup> Assi R. A., Darwis Y., Abdulbaqi I. M., Khan A. A., Vuanghao L., Laghari M. H.: *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arabian J. Chem.* 10, 691 – 707 (2019).
- <sup>70</sup> Kochuthressia K. P., Jaseentha M. O.: Phytochemical Investigation of Active Compounds In *Morinda citrifolia* Leaves. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.* 5, 98 – 103 (2015).
- <sup>71</sup> Ahmadi N., Mohamed S., Rahman H. S., Rosli R.: Epicatechin and scopoletin-rich *Morinda citrifolia* leaf ameliorated leukemia via anti-inflammatory, anti- angiogenesis, and apoptosis pathways in vitro and in vivo. *J. Food Biochem.* 43, (2019).
- <sup>72</sup> Pachauri S. D., Tota S., Khandelwal K., Verma P. R. P., Nath Ch., Hanif K., Shukla R., Saxena J. K., Dwivedi A. K.: Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: A behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *J. Ethnopharmacol.* 139, 34 – 41 (2012).

- 
- <sup>73</sup> Krebs K. G., Heusser D., Wimmer H., v knihe: *Thin-Layer Chromatography* (Stahl E.). Springer-Verlag, 2. vydanie, Berlín, Heidelberg, New York 1969.
- <sup>74</sup> Lucio A. S. S. C., da Silva Almeida J. R. G., da-Cunha E. V. L., Tavares J. F., Filho J. M. B.: Alkaloids of the annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *Alkaloids* 74, 233 – 409 (2015).
- <sup>75</sup> Phamiwon Z. A. S., Sheila J.: Diabetes and medicinal benefits of *passiflora edulis*. *World J. Pharm. Res.* 5, 453 – 465 (2016).
- <sup>76</sup> Hemingway S. R., Phillipson J. D.: Alkaloids of the Rubiaceae. *Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 17, 63 – 90 (1980).
- <sup>77</sup> Dey A., Mukherjee A., Chaudhury M.: Alkaloids from apocynaceae: origin, pharmacotherapeutic properties, and structure-activity studies. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 52, 373 – 488 (2017).
- <sup>78</sup> De Luca V., Salim V., Thamm A., Masada S. A., Yu F.: Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 19, 35 – 42 (2014).
- <sup>79</sup> Song Z., Ao M.: Research progress of alkaloids in *Uncaria*. *Med. Plant* 5, 56 – 58 (2014).
- <sup>80</sup> Zhang J., Zhang Ch., Xu F.-Ch., Quesheng, Zhang Q.-Y., Tu P.-F., Liang H.: Cholinesterase inhibitory isoquinoline alkaloids from *Corydalis mucronifera*. *Phytochemistry* 159, 199 – 207 (2019).
- <sup>81</sup> Parthiban E., Arokiyarai Ch., Ramanibai R.: *Annona muricata*: An alternate mosquito control agent with special reference to inhibition of detoxifying enzymes in *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189, 110050 (2020).