

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Přírodní látky a jejich biologická aktivita.
Screening alkaloidních rostlin na anticholinesterásový účinek**



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

Vedoucí rigorózní práce: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Paskov, květen 2021

Mgr. Ivana Valentová

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

RIGOROUS THESIS

**Natural substances and their biological activity.
Screening of alkaloid plants for anticholinesterase effect**



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

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

Paskov, May 2021

Mgr. Ivana Valentová

PROHLÁŠENÍ

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

Tato práce vznikla za podpory grantů specifického vědeckého výzkumu SVV 265002 a FRVŠ 664/2011.

Paskov, květen 2021

.....

podpis

Velice děkuji Prof. RNDr. Lubomír Opletalovi, CSc., za odborné vedení mé rigorózní práce, cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce. Také bych chtěla poděkovat doc. Ing. Kateřině Macákové, Ph.D., za změření inhibiční aktivity vůči cholinesterasám. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu katedry farmaceutické botaniky za příjemné prostředí a pomoc při řešení technických a teoretických problémů.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL PRÁCE	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Alzheimerova choroba.....	12
3.1.1	Demence	12
3.1.2	Patogeneze Alzheimerovy choroby	13
3.1.3	Léčba AD	15
3.1.3.1	Současné farmakologické postupy v léčbě Alzheimerovy choroby	15
3.1.3.2	Inhibitory cholinesteras.....	16
3.1.3.3	Parciální inhibitory NMDA receptorů (memantin).....	16
3.1.3.4	Další látky užívané k terapii - přídatná farmaka (non - evidence based).....	17
3.1.3.5	Nové perspektivy farmakoterapie	17
3.2	Biologicky aktivní látky přírodního původu s potenciálem ovlivňovat AD.....	18
3.2.1	Galanthamin.....	18
3.2.2	Huperzin A	19
3.2.3	Leptomerin, skimmianin	19
3.2.4	Chelidonin	19
3.2.5	Stefarotudin	19
3.2.6	Serpentin, katarantin, ajmalicin	19
3.2.7	Berberin	20
3.2.8	Vinkamin	20
3.2.9	Ginkgolid B	20
3.2.10	Kurkumin	20
3.2.11	α -Mangostin.....	20
3.3	Vybrané rostlinné taxony.....	21
3.3.1	<i>Euonymus europaeus</i> L.....	21
3.3.2	<i>Evolvulus alsinoides</i> (L.) L.....	22
3.3.3	<i>Flueggea suffruticosa</i> (Pall.) Baill.....	23
3.3.4	<i>Fritillaria imperialis</i> L.....	24
3.3.5	<i>Laurus nobilis</i> L.....	25
3.3.6	<i>Lycopodium clavatum</i> L.....	25
3.3.7	<i>Magnolia officinalis</i> Rehder & E.H.Wilson.....	26
3.3.8	<i>Papaver orientale</i> L.....	27
3.3.9	<i>Papaver somniferum</i> L.....	27

3.3.10	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Schult.) DC.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Materiál a vybavení.....	32
4.1.1	Rozpouštědla.....	32
4.1.2	Chemikálie	32
4.1.3	Přístroje a programy.....	32
4.1.4	Materiál	33
4.1.4.1	Pomocný materiál	33
4.1.5	Detekční činidla	33
4.1.5.1	Dragendorffovo činidlo.....	33
4.1.5.2	Mayerovo činidlo	33
4.1.6	Rostlinný materiál.....	33
4.2	Všeobecné postupy	34
4.2.1	Destilace a odpařování.....	34
4.2.2	Filtrace	34
4.2.3	Příprava sumárních a alkaloidních extraktů rostlinných drog.....	34
4.2.4	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči cholinesterasám.....	34
4.2.4.1	Příprava zdrojů lidských cholinesteras.....	34
4.2.4.2	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity.....	35
5	VÝSLEDKY	36
6	DISKUZE	44
7	LITERATURA	45
8	ABSTRAKT	52
9	ABSTRACT	53

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek č. 1: Galanthamin.....	18
Obrázek č. 2: Huperzin A.....	19
Obrázek č. 3: Prekurzor ZT1	19
Obrázek č. 4: Plody brslenu evropského.....	21
Obrázek č. 5: Květy vyvinutce kuřimorového	22
Obrázek č. 6: Plody tvrdodřevu křovitého	23
Obrázek č. 7: Květenství komonky krélovské.....	24
Obrázek č. 8: Habitus plavuně vidlačky.....	25
Obrázek č. 9: Thebain	27
Obrázek č. 10: Oripavin	27
Obrázek č. 11: Morfin	28
Obrázek č. 12: Thebain	29
Obrázek č. 13: Papaverin.....	29
Obrázek č. 14: Zahnuté trny na bázi listů vilkakory	30
Tabulka č. 1: Označení, původ a hmotnost jednotlivých rostlinných drog pro screening.....	33
Tabulka č. 2: Inhibiční aktivita extraktů rostlinných drog vůči lidským cholinesterasám.....	37
Tabulka č. 3: Inhibiční aktivita standardů vůči lidským cholinesterasám.....	43

1 ÚVOD

Rostliny byly již od pradávna člověkem využívány jako terapeutické léčebné prostředky. Prvotně se zpracovávaly a upravovaly celé rostliny nebo jejich části, poněvadž nebylo známo, která látka či skupina látek má vlastní léčebný efekt. Jejich účinek býval zjišťován pouze empiricky, často byl však připisován nadpřirozeným silám a magii. V dnešní době, s rozvojem analytických a separačních metod jsme schopni identifikovat, izolovat, zkoumat a následně využívat řadu rostlinných substancí. Spektrum přírodních obsahových látek je velmi rozsáhlé a množství jejich účinků taktéž, což představuje značné možnosti, terapeutického využití při léčbě chorob, z nich některé jsou v současnosti syntetickými léčivy hůře léčitelné [1].

Neurodegenerativní onemocnění představují rozsáhlou skupinu chorob centrálního nervového systému (CNS), při kterých předčasně zanikají některé populace nervových buněk, což má za následek velmi vážné psychické a neurologické příznaky.

K degeneraci nervových buněk CNS vedou patologické procesy jako excitotoxicita, oxidační stres, apoptóza a řada dalších faktorů, které nejsou dosud zcela objasněny. Výsledkem jejich působení je poškození a smrt buňky. Excitotoxicitu způsobují excitační aminokyseliny při vystupňované stimulaci NMDA-receptorů, ale i ostatních specifických receptorů pro excitační aminokyseliny, s indukovaným abnormálním zvýšením intracelulární koncentrace vápníkových iontů. Velké množství volných vápníkových iontů v buňce přispívá rovněž k aktivaci proteas, tvorbě volných radikálů a per oxidaci lipidů. Při oxidačním stresu jsou neurony k procesům excitotoxicity citlivější. K apoptóze spojené s agregací chromatinu a fragmentací DNA v buněčném jádře dochází při nedostatečném působení nervových růstových faktorů, kdy je poškozena genová transkripce, a naopak jsou aktivovány specifické proteasy inaktivující řadu intracelulárních proteinů. Neurony CNS mají ve srovnání s jinými tělovými buňkami velmi omezenou schopnost regenerace, proto je při jejich smrti ztráta trvalá. Úbytek nervových buněk vyvolává změny řady různých funkcí CNS spojené s demencí. Jedním z hlavních možných přístupů k léčbě neurodegenerativních poruch je farmakologický zásah ovlivňující aktivitu jednotlivých neurotransmiterových systémů CNS [2].

Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba představují jedny z nejzávažnějších neurodegenerativních onemocnění.

Podle Světové zprávy o Alzheimerově chorobě (World Alzheimer's Report 2013) se v příštích přibližně 40 letech počet seniorů, kteří jsou závislí na zdravotní péči v důsledku neurodegenerativního onemocnění téměř ztrojnásobí – ze 101 milionů v roce 2010 na 277 milionů v roce 2050. Téměř polovina seniorů přitom trpí Alzheimerovou chorobou nebo jinou formou demence. Zdravotní péče o tyto pacienty je odhadována na více než 600 miliard USD [3].

Projekt EuroCoDe (European Collaboration on Dementia) prokázal, že počet lidí s demencí v zemích Evropské unie v roce 2007 byl 6,1 milionu. V roce 2010 to bylo již 7,3 milionu. Celkové

náklady na demenci v těchto zemích byly odhadnuty na 130 miliard euro. V České republice je 110 000 – 130 000 lidí postižených syndromem demence, z toho asi dvě třetiny trpí Alzheimerovou nemocí. Na základě demografických prognóz lze předpokládat, že se tento počet do roku 2040 zdvojnásobí. Podle epidemiologických studií je patrné, že prevalence onemocnění se s věkem zvyšuje. Kdyby se teoreticky podařilo progresi onemocnění oddálit u potenciálního pacienta o 5 let, snížil by se celkový počet nemocných o polovinu [5].

Parkinsonova choroba je dalším velmi častým neurodegenerativním onemocněním, mající tři hlavní projevy: svalovou ztuhlost (rigor), nehybnost (akineze) a třes v klidu (tremor), který je patrný především na ruce. Toto onemocnění souvisí s narušením dopaminergních neuronů, které vedou od substantia nigra ke corpus striatum, kde se podílejí na regulaci extrapyramidových motorických výstupů tím, že tlumí aktivitu cholinergních nervů. Příčinou onemocnění je nedostatek dopaminu s relativní převahou acetylcholinu. Současná léčba spočívá v potlačení cholinergní aktivity nebo vyrovnání nedostatku neurotransmiteru dopaminu [6].

V současnosti existuje jen léčba substituční (L-DOPA) a symptomatická (anticholinergika). Vedle L -dopy se terapeuticky využívá selegilin, u kterého jsou ve vyšších dávkách pozorovány antidepresivní účinky, poněvadž nedostatek dopaminu se podílí i na patogenezi depresivní poruchy [7].

Třetí v pořadí je progresivní autosomálně dominantně dědičná Huntingtonova choroba. Toto geneticky podmíněné onemocnění, které se nejčastěji začíná projevovat ve 4. až 5. dekádě života. Genetickou podstatou choroby je abnormní zmnožení tripletů CAG v lokusu genů lokalizovaného na krátkém raménku 4. chromozomu, jehož patologickým produktem je vadný protein huntingtin, který se zřejmě podílí na apoptických procesech zejména ve středně velkých ostnitých GABA-ergních neuronech striata. Tato vzácná nemoc se projevuje kombinací neurologické (choreatické hyperkineze, distonie, poruchy chůze apod.) a psychiatrické (změny osobnosti, afektivní, úzkostné chování, psychotické příznaky a demence) symptomatologie [8, 9, 10, 11].

Z těchto údajů jasně vyplývá, že AD a jiné neurodegenerativní choroby jsou nejčastějšími příčinami syndromu demence, který představuje jeden z nejzávažnějších celosvětových problémů ve zdravotnické, sociální a zejména ekonomické sféře.

Přestože v minulých letech nebyla věnována tomuto onemocnění dostatečná pozornost, dnes patří výzkum Alzheimerovy choroby mezi priority. Tímto se nabízí široké spektrum pro nový vývoj a výzkum účinných látek syntetického a přírodního původu.

V oblasti přírodních léčiv představují perspektivní skupinu alkaloidy, sekundární metabolity rostlin, jejichž význam pro rostliny není zcela objasněn; pravděpodobně je syntetizují pro vlastní ochranu proti škůdcům, snad hrají roli při biosyntetických pochodech rostlinného metabolismu. Jsou syntetizovány z aminokyselin, ve své molekule obsahují dusík často vázaný do heterocyklu. Výjimkou jsou pseudoalkaloidy (steroidní, terpenické), které mají jiný biosyntetický původ. Rostlina obvykle obsahuje jeden hlavní alkaloid doprovázený řadou strukturně příbuzných typů. Obsah alkaloidů se mění zevními vlivy působícími na rostliny, kolísá během vegetace a zpravidla se snižuje či se jejich tvorba

zastavuje při začátku kvetení. Ve vysokých dávkách mají toxické až letální působení, v nízkých dávkách jsou prospěšnými farmaky [1, 12]. Využívají se jako parentní látky nebo slouží jako modelové struktury pro tvorbu nových substancí s výhodnějšími vlastnostmi [13].

V současné době nelze Alzheimerovu chorobu vyléčit, lze však včasným zahájením léčby průběh onemocnění značně zpomalit. V medicínské praxi nachází uplatnění galanthamin, který inhibuje acetylcholinesterasu a zároveň zesiluje působení acetylcholinu na nikotinových receptorech. Dalšími používanými inhibitory acetylcholinesterasy jsou donepezil, rivastigmin [14].

Jak už bylo řečeno, hledání nových perspektivních inhibitorů cholinesteras je v centru pozornosti řady výzkumných skupin. Jednou z nich je pracovní skupina ADINACO Research Group na katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové dříve pod vedením Prof. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc., nyní pod vedením Prof. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D.

2 CÍL PRÁCE

Cíl rigorózní práce:

- 1) Na základě literární rešerše provést výběr 10 taxonů vyšších rostlin s obsahem alkaloidů, u nichž je předpoklad účinku na metabolismus mozkové tkáně.
- 2) Zajistit vzorky morfologických částí těchto rostlin.
- 3) Provést přípravu sumárního ethanolového extraktu a vyčištěného ethyl acetátového extraktu (alkaloidního koncentrátu).
- 4) Podílet se na stanovení aktivity vůči lidské acetyl- a butyrylcholinesterase (*in vitro*) u obou typů extraktů (stanovení IC_{50}).
- 5) Vyhodnotit výsledky a navrhnout taxon, který je z hlediska výše uvedených biologických účinků perspektivní pro další studium (izolaci účinných látek).

Tato práce volně navazuje na mou diplomovou práci Biologická aktivita obsahových látek XVI. Alkaloidy *Papaver somniferum* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu, v níž jsem izolovala z makoviny thebain a sledovala jeho aktivitu na erytrocytární AChE a sérovou BuChE.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

3.1.1 Demence

Pojem senilní demence nalezneme již v Blancardově slovníku anatomických a klinických názvů, který byl vydán v Londýně v roce 1726 [15]. V případě demence Alzheimerova typu se po skrytém začátku nemoci objevují klinické příznaky počínající demence u rizikové skupiny osob starších 60 let jako sporadická forma Alzheimerovy nemoci (AD). Téměř 10 % nemocných s AD však trpí geneticky podmíněnou familiární formou nemoci, u nichž lze první příznaky demence pozorovat již po 40. roce života.

Demence jsou choroby, vznikající na podkladě poruchy kognitivních funkcí (paměť, vnímání, motivace, myšlení aj., souhrnně označované jako inteligence). Demence lze zjednodušeně rozdělit na demence primárně degenerativní (neurodegenerativní, atroficko-degenerativní poruchy) a na demence sekundární neboli symptomatické, kde demenci spouští systémové onemocnění, intoxikace, infekce a další noxy, postihující také centrální nervový systém. Sekundární demence se dají rozdělit ještě na demence vaskulární a ostatní (např. infekční etiologie, prionové, posttraumatické, alkoholové a další). Alzheimerova choroba je nejčastější příčina demence, představuje minimálně 50 % všech demencí ve své čisté formě a dalších 10–20 % demencí je smíšené etiologie, kde je Alzheimerova choroba smíšená s jinou příčinou, jako jsou vaskulární příčiny a jiné [16].

Z hlediska příčiny dělíme syndrom demence zjednodušeně takto: primární demence, která má neurodegenerativní základ, sekundární demence vznikající na podkladě různých příčin a demence smíšená, mající v určité proporcii obě předchozí formy. Hlavní představitelé primární demence jsou Alzheimerova nemoc (sporadická AD), familiární Alzheimerova nemoc (FAD) a frontotemporální demence (FTD). Nejvýznamnějším zástupcem sekundárních demencí je vaskulární (multiinfarktová) demence.

Vznik AD významně ovlivňují rizikové faktory, jakými jsou narůstající věk populace, nadváha, hypercholesterolémie a dále onemocnění diabetes mellitus typu 2, které až zdvojnásobují pravděpodobnost vzniku sporadické (pozdní) formy AD. Tato forma má i své významné genetické riziko. Týká se genu pro alipoprotein E (APOE), kdy přítomnost dvou kopií alely $\epsilon 4$ představuje 50% riziko vzniku sporadické formy AD. Také příbuzní osoby trpící AD mají téměř 40% riziko, že onemocní AD, pokud se dožijí 85 let. Toto zjištění dokládá, že základ sporadické formy AD je dán jedním nebo více kandidátními geny s neúplnou penetrací jako kombinace těchto genů s rizikovými faktory prostředí. Naopak FAD je monogenně podmíněné onemocnění vyznačující se autozomálně dominantní dědičností. Tu charakterizuje vysoká penetrace jednoho ze 4 uvedených genů: gen pro amyloidní prekurzorový protein (APP) na dlouhém raménku chromozómu 21, gen pro τ -protein na chromozómu 17, gen

pro presenilin 2 (PS2) na chromozómu 1 a gen pro presenilin 1 (PS1) na chromozómu 14. Mutace PS1 představuje hlavní genetický defekt u FAD, podmiňující časný začátek nemoci. Příčinou je zvýšené štěpení APP na A β peptidy. Proto se současný vědecký výzkum soustřeďuje na studium degradace APP cestou metabolické (amyloidní) kaskády. Rozvíjí-li se cévní poškození společně s AD, vzniká smíšená demence [17].

Průběh demence začíná velmi pozvolně a nenápadně, nejprve poruchami krátkodobé paměti, zapamatováním si nových informací, poruchami pozornosti a řeči. Pacient obtížně nachází slova k vyjádření. Postupně dochází k poruše logického myšlení, soudnosti, může se objevit dezorientace v čase i prostoru. Téměř pravidelně dochází k výskytu tzv. behaviorálních a psychologickým příznakům demence (BPSD), jako jsou poruchy emocí typu depresivní nebo úzkostné nálady, poruchy spánku a jiné typy poruch chování. Schopnost pacienta v aktivním životě (např. telefonovat, schopnost obléct se, udržovat základní tělesnou hygienu, samostatně se najíst) se v pozdních stádiích značně snižuje. Postižení často umírají na interkurentní choroby a úrazy, na které by pravděpodobně stejně starý jedinec bez AD nezemřel. Průběh demence Alzheimerova typu bývá obvykle 7–10 let od prvních příznaků do smrti. Existují i případy kdy trvá i více než 15 let nebo naopak i kratší (především u FAD) [18].

3.1.2 Patogeneze Alzheimerovy choroby

U AD je snížena centrální acetylcholinergní transmise. Postižena jsou zejména acetylcholinergní vlákna, vedoucí z bazálního Meynertova jádra difuzně do kortexu, ale také další acetylcholinergní vlákna, např. kmenová, podílející se na regulaci kvalitativní úrovně vědomí [19].

Hladina enzymu, který syntetizuje acetylcholin z cholinu a acetylkoenzymu A – cholinacetyltransferasy je snížena. Nižší je také tzv. vysoko afinitní natrium-dependentní cholinové zpětné vychytávání, a tedy nabídka substrátu pro syntézu acetylcholinu. Důsledkem tohoto procesu je snížení presynaptického uvolnění acetylcholinu. Rovněž je snížen počet nikotinových acetylcholinergních receptorů, zatímco počet muskarinových acetylcholinergních receptorů zůstává relativně nezměněn. Acetylcholin je odbouráván v synaptické šterbině enzymy cholinesterasami: v naprosté převaze je acetylcholinesterasa (AChE), zatímco podíl butyrylcholinesterasy (BuChE) je zanedbatelný. U AD se podíl molekul BuChE zvyšuje, dochází k novotvorbě těchto molekul ve zmobilizovaných gliových elementech v oblasti plaků. BuChE se poté podílí na odbourávání acetylcholinu a tak přispívá k jeho nedostatku. Mění se také zastoupení jednotlivých forem AChE. Za standardních podmínek je v mozku jako majoritní tetramer označovaný jako G4 a jako minoritní (zastoupený asi 3 %) monomer označovaný jako G1, kdežto při Alzheimerově chorobě výrazně roste proporcionální zastoupení G1 [19].

Porucha acetylcholinergní transmise je přítomna již v počátečních stádiích Alzheimerovy choroby. Podílí se především na poruše paměti i dalších kognitivních funkcí, ale také na poruchách aktivit denního života i tzv. behaviorálních a psychologických příznacích demence (poruchy chování, přidružené psychotické příznaky, poruchy emotivity i spánku) [19].

Dalším základním neurodegenerativním článkem je patrně tvorba patologického proteinu β amyloidu [20].

β -amyloid se řadí mezi proteinové klastry. Je to mezibuněčný protein tvořící plaky, které likvidují mitochondrie okolních buněk, a navíc znemožňují buněčnou regulaci. Předpokládá se, že zničení plaků by vedlo k zastavení nebo alespoň potlačení progresu AD. Tato možnost terapie je však dnes pouze ve fázi výzkumu [21].

Tento polypeptid o 39–43 AMK a M_r 4,5 kDa, vzniká při degradaci APP, což je integrální membránový glykoprotein s jedním transmembránovým úsekem, který obsahuje sekvenci β -amyloidu [21].

Předpokládá se, že amyloid funguje jako membránový receptor, autokrinní růstový regulátor nebo protein podílející se na adhezi buněk (podobně jako konektin).

Patogenetické mechanismy vyvolané β -amyloidem, které vedou k poškození funkce a nakonec k odumírání neuronů, a tím k projevům onemocnění, nejsou známy [21].

V mozku pacienta trpícího Alzheimerovou chorobou se vyskytují dva různé proteinové agregáty: smotky chybně složeného cytoskeletárního proteinu τ a plaky z proteinových agregátů tvořených fragmenty APP. Přítomnost dvou druhů proteinových agregátů $A\beta$ vedla ve vědecké obci k prudkým sporům o to, který z těchto proteinů je skutečnou příčinou onemocnění a jaký jen vedlejším příznakem. Pokud je APP štěpen nadměrně, vznikají pak delší fragmenty (o 42–43 aminokyselinách) [21]. APP je transmembránový protein nejasné biologické funkce. Blízko *N*-konce tohoto proteinu se vyskytuje sekvence 42 aminokyselin zvaná amyloidní β -peptid. Právě tento fragment totiž vytváří ony proteinové agregáty nalézané v mozku pacientů při diagnostikované AD. Tento peptid snadno vytváří fibrilární agregované struktury, které jsou neurotoxické a vedou k rozvoji tohoto onemocnění [21].

Neurotické plaky se nacházejí sporadicky i u kontrolních jedinců. U pacientů s AD jsou amyloidní plaky přítomny ve velkém množství, zejména v hippocampu. Postupem doby jsou plaky infiltrovány reaktivními mikroglialními buňkami a obklopovány astroglialními buňkami. Přítomnost těchto buněk v okolí amyloidových plaků je spojena s uvolňováním velkého množství volných kyslíkových radikálů a cytokinů, což vede až k projevům aseptického zánětu, a nakonec k odumírání okolních neuronů.

APP je štěpen třemi specifickými proteasami: α -sekretasou, β -sekretasou, γ -sekretasou [21].

APP je při normálních podmínkách štěpen enzymem α -sekretasou na fragmenty, které jsou plně solubilní a mají své fyziologické úlohy. Za patologických podmínek Alzheimerovy choroby a demencí s Lewyho tělísky je APP následně štěpen patologickými enzymy β - a γ -sekretasou na delší fragmenty, než odštěpuje α -sekretasa. Tyto fragmenty (42 a více aminokyselin) jsou pak solubilní, koagulují a polymerují v extracelulárním prostoru, a vzniká tak β -amyloid, jenž pak tvoří základ plaků. Toxicita β -amyloidu následně zřejmě vede k dalšímu typu proteinové generace – k hyperfosforylaci intraneuronálního

τ -proteinu. Ten ve své změněné formě tvoří párově helikální filamenta, která jsou podkladem neurálních klubek (tangles). Takto postižené neurony pak podléhají buněčné smrti – apoptóze [19].

Výrazně je postížen centrální acetylcholinergní systém, a později i systém excitačních aminokyselin (glutamatergní systém) a další neurotransmitterové systémy.

Systém excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát aj.) je s největší pravděpodobností nejrozšířenější mozkový neurotransmitterový systém. Receptory excitačních aminokyselin se dělí na metabotropní (aktivují druhé posly) a ionotropní (otevírají iontové kanály). *N*-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou receptory, které otevírají Ca^{2+} kanály. Na NMDA receptorech se odehrává jeden ze základních mechanismů paměti – dlouhodobá potenciace (long-term potentiation); při opakovaném působení stejného podnětu jsou následné excitační postsynaptické potenciály vždy větší. U Alzheimerovy choroby, ale také u jiných neurodegenerativních změn i u vaskulárních a posttraumatických změn CNS, se nadměrně uvolňují excitační aminokyseliny (excytotoxicita); následně pak dochází ke zvýšenému influxu iontů vápníku do neuronů, k aktivaci enzymů typu proteinkinas a fosfatas, ke změnám nitrobuněčných proteinů, a nakonec k odkrytí genu pro programovanou buněčnou smrt – apoptózu. Postižené neurony zanikají. Jiný typ excitotoxicity spočívá v tom, že na NMDA receptorech vznikají jakési přenosové šумы – vytváří se velké množství potenciálů, mezi nimiž zaniká potenciál, který má být přenesen. Tím je narušen mechanismus dlouhodobé potenciace [19].

3.1.3 Léčba AD

3.1.3.1 Současné farmakologické postupy v léčbě Alzheimerovy choroby

Léčba AD i dalších demencí vychází ze znalosti jednotlivých patogenetických pochodů, nikoli z objasnění právě příčiny vzniku onemocnění. Současná terapie nám tedy umožňuje chorobu pouze modulovat, především prodlužovat lehká stadia a oddalovat těžká stadia demence, která jsou spojena s nesoběstačností a silnou zátěží jak pacientů, tak jejich pečovateli [16].

Obecně můžeme hovořit o dvou postupech využívaných v dnešní terapii AD.

- **Evidence based treatment** (IChE, inhibitory NMDA receptorů)
- **Non evidence based treatment** (přídavná farmaka)

Relativně nedávno byly do praxe zavedeny farmaka prokazatelně zpomalující průběh choroby. Jejich užití je tedy racionální, založené na důkazech (evidence based), získaných z kvalitních, dvojité zaslepených, placebem kontrolovaných studií. Jedná se o inhibitory AChE (IChE) u lehkých a středních forem AD a inhibitory NMDA receptorů (memantin) v pokročilých stadiích AD [20].

3.1.3.2 Inhibitory cholinesteras

Tato léčiva příznivě ovlivňují centrální acetylcholinergní přenos, náleží do skupiny tzv. kognitiv. Od IChE se očekává, že budou dobře procházet hematoencefalickou bariérou, budou ovlivňovat obě formy mozkových AChE a nebudou ovlivňovat periferní formy cholinesteras, aby nepůsobily nežádoucí vedlejší efekty. Některé z inhibitorů inhibují i mozkové butyrylcholinesterasy. Způsob inhibice cholinesteras je reverzibilní (inhibice trvá tak dlouho, jak dlouho je přítomna látka nebo její aktivní metabolit v plazmě) nebo pseudoireverzibilní (inhibice trvá déle, než je přítomnost účinné látky v plazmě, farmakum je odbouráváno přímo molekulami cholinesteras) [16].

Centrální IChE jsou doposud nejúčinnější léčiva pro terapii lehkých až středně pokročilých Alzheimerových demencí. Podstata terapeutického působení u AD je zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin a tím prodloužení vazby acetylcholinu na jeho receptory s následujícím zvýšením acetylcholinergní transmise. Bylo zjištěno, že molekuly cholinesteras se vyskytují v mozku i v jiných lokalizacích, než jsou distribuována acetylcholinergní vlákna. Podílejí se zřejmě na tvorbě a toxicitě β -amyloidu. Inhibitory AChE především mají efekt na zpomalení průběhu alzheimerovských demencí, na oddálení přechodu demence do těžkých stadií. V dnešní době jsou v naší republice i ve většině zemí Evropy a v USA terapeuticky využívány 3 látky: donepezil, rivastigmin, galanthamin [22].

- **Donepezil** (ARICEPT®) je v současnosti nejužívanější centrální inhibitor AChE ve světě, u nás je rovněž užíván. Dalším zástupcem piperidinových derivátů je potenciální Ikopezil, který se momentálně nachází v terciálním stadiu klinické studie. Vyniká vyšší specifitou pro molekuly AChE [23].
- **Rivastigmin** (EXELON®) derivát karbamátu, jeden ze tří u nás používaných (a ve světě nejpoužívanějších) inhibitorů cholinesteras. Působí pseudoireverzibilní inhibicí cholinesteras a kromě cerebrálních AChE účinně inhibuje i BuChE [23].
- **Galanthamin** (REMINYL®) tento alkaloid vyskytující se u některých druhů sněženek a narcisů je látka používaná i u nás. Má dualistické účinky na acetylcholinergní systém; mimo toho, že způsobuje reverzibilní inhibici AChE, taktéž alostericky moduluje pre-, i postsynaptické nikotinové receptory [23]. A mnoho dalších viz. látky přírodního původu.

3.1.3.3 Parciální inhibitory NMDA receptorů (memantin)

Důležitým patologickým článkem u AD je stimulace apoptických dějů, je zvýšený vstup vápníku do neuronů. Tento proces je zprostředkovan kalciovými kanály, které jsou u této choroby pravděpodobně tvořeny více než za normálních podmínek. Inhibitory vápníkových kanálů napětově řízených (otvírají

a zavírají se dle změn potenciálu neuronální membrány) nebyly shledány u AD samy o sobě dostatečně účinnými (cinnarizin, nimodipin aj.). Odlišný typ vápníkových kanálů je adiktivní na ionotropních receptorech excitačních aminokyselin. Klinický efekt byl shledán u blokátoru NMDA (*N*-methyl-D-aspartátového) receptoru memantinu (Akatinol) [23].

3.1.3.4 Další látky užívané k terapii – přídatná farmaka (non-evidence based)

Jsou známy i další možnosti terapie vycházející z obecných patogenetických řetězců, ale jejich použití již není jednoznačně založeno na důkazech. Tyto substance, užívané ke zlepšení kognitivních funkcí, nemají účinnost již tak přesvědčivě dokázanou jako inhibitory cholinesteras a memantin. Jejich účinek není již jednoznačně založen na dostatečných důkazech, někdy je spíše empirický [22].

Některá z nich přesto vykazují mírnější prokazatelné efekty na kognitivní i nekognitivní funkce a jsou tedy vhodné pro kombinaci s IChE i s memantinem. Mezi takováto léčiva řadíme např. extractum ginkgo bilobae nebo nicergolin. Dále jsou používána farmaka s nootropní aktivitou (piracetam, pyritinol), zametače volných kyslíkových radikálů (tokoferol), nervové růstové faktory (celebrolysin), které jsou důležité pro plasticitu a růst neuronů. Cerebrolysin zvyšuje průnik glukosy do mozku a má příznivý vliv na porušený oxidativní metabolismus v mozkové tkáni, aplikace probíhá ve formě infúze [20, 24].

3.1.3.5 Nové perspektivy farmakoterapie

Jedním diskutovaným tématem je vakcinace proti β -amyloidu. Tato vakcína by obsahovala monoklonální protilátky, které by zabraňovaly jeho vzniku. Na formaci β -amyloidu se nedílně podílí i enzym glykogensyntasakinas 3- β (GSK-3 β), proto jsou hledány substance schopné tento enzym ovlivnit, nejlépe inhibovat. Účinek na snížení aktivity GSK-3 β byl zjištěn u antidiabetika rosiglitazonu a u modulátoru nálady lithia.

Současný výzkum je zejména zaměřen na inhibitory β - a γ -sekretas. Slibnou substancí byl semagacestat (Fleisher et al., 2008) [25], inhibující gama-sekretasu, dnes již definitivně vyřazena z třetí fáze klinického bádání.

Je zkoumán rovněž klinický účinek několika látek mající pozitivní vliv na acetylcholinergní transmisí jinými cestami než inhibicí cholinesteras. Dále jsou vyvíjeny nové druhy inhibitorů cholinesteras [19]. Další ze skupiny zkoumaných látek jsou statiny [19]. V mnoha recentních studiích byl potvrzen vztah AD s poruchami metabolismu lipidů. Byl již podrobně popsán vztah AD zvýšenou hladinou cholesterolu, tak s přítomností izoformy ApoE4. Jejich úloha v tomto směru je stále ověřována v četných studiích [26].

Jiné cesty inovativní terapie vychází z inhibice především cholinesterasy mimo acetylcholinergní vlákna. Tato vlastnost se předpokládá u tolserinu, jehož aplikace by minimalizovala toxicitu β -amyloidu.

Nadějnou možností je použití čistých inhibitorů BuChE (cymserin aj.). I když se přímo nejedná o terapii farmaky, je potřeba zmínit se o implantaci kmenových buněk do mozkové tkáně pacienta s Alzheimerovou nemocí jako o budoucí léčebné metodě.

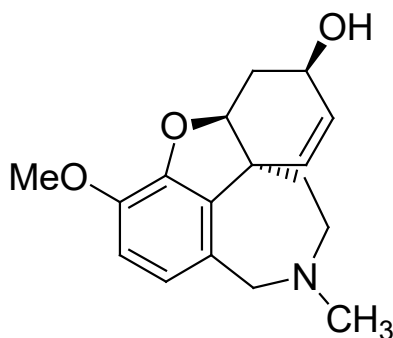
Mezi jiné způsoby zásahu do cholinergní transmise v mozku je aplikace selektivních agonistů nikotinových receptorů. V řadě výzkumných prací bylo prokázáno, že jejich stimulace přispívá k poklesu tvorby a ukládání neurotoxického β -amyloidu, což by mohlo mít pro zpomalení průběhu choroby nemalý význam. Řada epidemiologických studií poukazuje na snížení incidence AD u kuřáků. Tento efekt je připisován nikotinu, což podměnilo intenzivní sceening látek s nikotinovým účinkem, které by sloužily jako nová potenciální léčiva AD. Dvě takovéto látky byly nedávno nalezeny. První v sekretu jedové žlázy severoamerického mravence *Aphaenogaster rudis* a druhá v toxickém sekretu jihoamerické žáby *Epipedobates tricolor* [28].

3.2 Biologicky aktivní látky přírodního původu s potenciálem ovlivňovat AD

Z přírodních látek je dnes jediným registrovaným léčivým přípravkem s indikací léčby AD alkaloid galanthamin, proto byl ještě donedávna výzkum primárně soustředěn na přírodní látky s anticholinesterasovou aktivitou alkaloidního typu. Dnes je pole zkoumání rozšířeno i o přírodní látky nealkaloidní. Hlavním cílem vědeckého zkoumání je nalézt takovou substanci, která by vykazovala efektivní inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám nebo by ovlivňovala další patofyziologické procesy spojené s AD (vznik β -amyloidu ukládání senilních plaků, oxidační stres, aj.) bez toxického dopadu na organismus pacienta. Do popředí zájmu západního světa a Evropy se dostávají rostliny tradiční východní medicíny.

3.2.1 Galanthamin

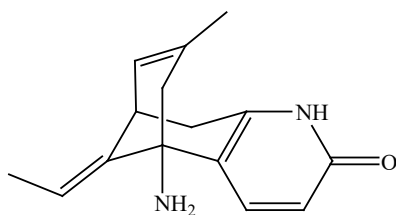
(*Galanthus woronovii*, *Narcissus* sp. atd.; Amaryllidaceae) terciární alkaloid galanthaminového typu; výrazně méně účinné jsou alkaloidy lykorinového typu (assoanin, $4 \times$ nižší aktivita z důvodu planární struktury molekuly). V klinické praxi užíván pro silný inhibiční efekt proti AChE. Selektivní, duální inhibitor. Reverzibilně inhibuje AChE a zároveň posiluje účinek acetylcholinu na nikotinových receptorech alosterickou vazbou. Důsledkem této modulace dochází k výraznému posílení cholinergního systému a tím zlepšení kognitivních funkcí pacienta. Dobře snášen, určité periferní cholinergní účinky, podstatně účinnější inhibitor než takrin [29], dnes obsoletní pro svou hepatotoxicitu.[30]



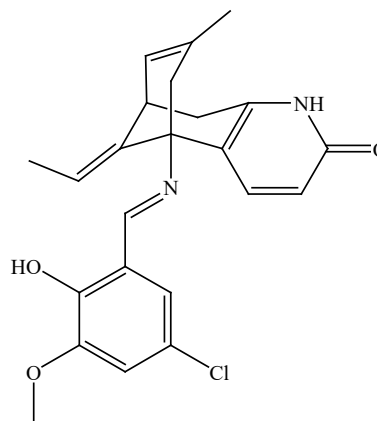
Obrázek č. 1: Galanthamin

3.2.2 Huperzin A

(*Huperzia serrata*, Huperziaceae), alkaloid, výrazný inhibitor AChE, neuroprotektivní aktivita s výrazným efektem na zlepšení paměťových funkcí, úspěšně terapeuticky využíván v Číně na základě dvojitě zaslepené klinické studie, jež potvrdila bezpečnost a vysoký terapeutický index v AD. Je nutno říci, že jeho schopnost zvyšovat nabídku acetylcholinu v mozkové kůře je 2× až 8× efektivnější než u jiných inhibitorů [31]. V Evropě právě probíhá klinická studie s proléčivem ZT-1 [32].



Obrázek č. 2: Huperzin A



Obrázek č. 3: Prekurzor ZT1

3.2.3 Leptomerin, skimmianin

(*Esenbeckia leiocarpa*, Rutaceae), alkaloidy testovány *in vitro*, potvrzena silná inhibiční aktivita proti AChE, u leptomerinu s hodnotami $IC_{50} = 2,5 \mu M$; jako referenční látka byl použit galanthamin s hodnotou $IC_{50} = 1,7 \mu M$ [32].

3.2.4 Chelidonin

(*Chelidonium majus* L., Papaveraceae), alkaloid, struktura isochinolinu, výzkum proběhl na katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlově. Byl prokázán významný inhibiční efekt vůči lidské krevní acetylcholinesterasě (HuAChE) a plazmatické butyrylcholinesterasě (HuBuChE) [34].

3.2.5 Stefarotudin

(*Stephania rotunda*, Menispermaceae), zcela nový protoberberinový alkaloid, izolován z extraktu kořene. Anti-acetylcholinesterasové působení na krysí cerebrální ACh *in vitro* [37].

3.2.6 Serpentin, katarantin, ajmalicin

(*Catharanthus roseus*, Apocynaceae), v roce 2011 proběhla první studie *in vitro* těchto tří látek. I přes zjištění nižšího inhibičního účinku se předpokládá, že po drobných modifikačních úpravách struktur, se jedná o velmi perspektivní a silné inhibitory AChE 38.

3.2.7 Berberin

(*Coptis chinensis*, Berberidaceae aj.), isochinolinový alkaloid (součást tradiční čínské bylinné medicíny *Rhizoma coptidis ext.*) s antioxidačními vlastnostmi. Studie na potkanech objasnila jeho příznivý vliv při léčbě AD. Oxidativní stres s nadprodukcí volných radikálů má podíl na patogenezi Alzheimerovy choroby. Zda jde o primární příčinu AD nebo průvodní jev není objasněno. Výzkum byl zaměřen na protektivní účinek berberinu při oxidačním stresu u nervových buněk PC12 vyvolaném H₂O₂ při indukované apoptóze. Životaschopnost buněk PC12 se zvýšila prostřednictvím antioxidačních účinků berberinu [35,36].

3.2.8 Vinkamin

(*Vinca minor* L., Apocynaceae), alkaloid, extrahován z kořene, periferní vasodilatátor, který zvyšuje cerebrální průtok krve a kyslíku s využitím glukózy nervové tkáně. Stopové prvky jsou nezbytné pro normální mozkové funkce, pomáhají při tvorbě neurotransmiterů a podílí se na antioxidační obraně a intracelulární regulaci a modulaci nervových buněk. Neurodegenerativní onemocnění mimo jiné souvisí se poruchou hladiny stopových prvků v mozku v důsledku stárnutí. Cílem této studie bylo detekovat hladinu zinku (Zn), mědi (Cu), železa (Fe), selenu (Se), a chrómu (Cr), v mozku potkanů léčených i. m. vinkaminem a bez něj. Vinkamin snížil koncentraci všech daných prvků, u Fe se hladina redukovala o více než 50 % [39].

3.2.9 Ginkgolid B

(*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) antioxidant, glykosid, v terapeutické praxi běžně využíván.

3.2.10 Kurkumin

(*Curcuma longa*, Zingiberaceae), přirozené barvivo, antioxidant, protizánětlivý, lipofilní, fenolický flavonoid zlepšuje kognitivní funkce u pacientů s AD, schopnost inhibice aktivity AP-1, transkripčního faktoru, který se podílí na expresi amyloidu [40].

3.2.11 α -Mangostin

(*Garcinia mangostana*, Clusiaceae), xanthon, flavonoid, silná antioxidant, zabraňuje shlukování a vznik depozit β -amyloidu [41].

A mnoho dalších jako jsou inhibitory propylendopeptidasy, vasodilatační látky, látky modifikující zánět, stimulatory nikotinových receptorů, M₂ antagonisté muskarinu aj.

3.3 Vybrané rostlinné taxony

3.3.1 *Euonymus europaeus* L.

brslen evropský (Celastraceae)



Obrázek č. 4: Plody brslenu evropského [91]

Opadavý zelený keř, listy jednoduché, kopinaté, plodem je tobolka. Všechny části rostliny vykazují toxicitu, zejména plody. Červená semena charakterizují oranžový míšek [42]. Semena obsahují alkaloidy a kardioaktivní glykosidy různých struktur. Hlavní zastoupení mají seskviterpeny – majoritní je alkaloid evonin izolován ze semen, dalšími jsou deoxyevonin, isoevonin, evozin, evolin, evomin aj. Nově byly izolovány makrolidy frangulin, frangamin, frangufolin a alkaloid 1- benzyltetrahydroisochinolové struktury armepavin známý jako alkaloid D. Tyto nové látky podléhají chemotaxonomickému zájmu. Listy rostliny obsahují alkaloidy kofein a theofylin, teobromin byl izolován ze semen [43, 44, 45, 46, 47, 48, 49].

3.3.2 *Evolvulus alsinoides* (L.) L.

vyvinutec kuřímorový (Convolvulaceae)



Obrázek č. 5: Květy vyvinutce kuřímorového [92]

Synonymum: *Convolvulus alsinoides*; Dwarf Morning Glory

Kvetoucí bylina, stonky jsou 20-70 cm dlouhé, nebývají propletené. Obvykle velmi silně pokryta jemným bílými chloupky po celém těle. Listy kopinaté až vejčité, vrchol je tupý s malým. Květy jsou světle modré nebo téměř bílé, 6 - 8 mm v průměru. Plodem je tobolka, obvykle obsahuje 4 semena. Obsahové látky: alkaloidy (betain, šankapušpin, evolvin, skopolin, skopoletin aj.), steroly, třísloviny, fenolické sloučeniny atd.

Pro své psychotropní, protizánětlivé, antioxidační a zejména nootropické účinky využíván v tradiční medicíně Ayurveda v celé východní Asii [49].

V posledních letech proběhly klinické studie, které potvrdily jeho pozitivní účinek na kognitivní funkce. Jako silný antioxidant (anti-ROS aktivita) a nootropikum se jeví jako slibný kandidát při léčbě neurodegenerativních chorob nejen u AD [50, 51, 52].

3.3.3 *Flueggea suffruticosa* (Pall.) Baill.

tvrdodřev křovitý (Phyllanthaceae)



Obrázek č. 6: Plody tvrdodřevu křovitého [93]

synonymum: *Securinea suffruticosa* (Pall.) Rehder

Opadavá dřevina, větve tenké, listy jednoduché, květy malé, zelenkavé. Koruna chybí. Kalich poskládan z pěti lístků. Semeník svrchní, obsahuje 3 srostlé plodolisty. Plodem je tobolka kulovitého tvaru. Tradiční keř Východní Asie. V ČR pěstována jen ojedinele jako součást parků. Latinské pojmenování podle vlastnosti dřeva: *securis* (sekera) a *nego* (odporuji) [76].

V tradiční čínské medicíně je zařazen mezi 50 základních léčivých bylin. Používá se k terapii impotence, různého druhu ochrnutí, duševních poruch a jako antirevmatikum [77].

Tento terapeutický potenciál založen na přítomnosti alkaloidů strukturně odvozeny od indolizidinu. Představitelem je securinin. Velmi pozitivní až překvapivé výsledky byly pozorovány u pacientů trpících amyotrofickou laterální sklerózou, kdy došlo k výraznému zlepšení mozkových funkcí. Tento efekt by mohl pomoci i při dalších neurodegenerativních onemocnění včetně AD [78, 79]. Mezi jeho další detekované účinky patří: stimulace aktivity makrofágů (možnost řízení infekce), antikarcinogenní, kdy došlo k poklesu výskytu metastáz u kolorektálního karcinomu (autofagie a apoptóza rakovinotvorných buněk) [80, 81, 82].

Sekurinin se jeví jako velmi perspektivní látka a je součástí mnoho klinických studií.

3.3.4 *Fritillaria imperialis* L.

komonka královská (Liliaceae)



Obrázek č. 7: Květenství komonky královské [94]

Vytrvalá rostlina původem z orientu. Velké zvoncovité květy oranžové až červené, vzácně žluté, tvořící okolík, lodyha přímá až 1 m vysoká, ve střední části hustě olistěná, poté zcela holá, nad květenstvím vytváří mnoholistý chochol. Listy podlouhlé až 15 cm dlouhé. Cibule asi 6 cm velká [42]. Pro obsah steroidních alkaloidů jedovatá. Nejvýznamnější alkaloidy jsou imperialin, impericin a forticin izolovány z cibule rostliny, u níž byl zjištěn inhibiční efekt vůči AChE i BuChE. Imperialin se navíc prokázal jako selektivní antagonist receptoru M_2 .

V současnosti *Fritillaria* není farmaceuticky využívána, ale účinky alkaloidů jsou nadále zkoumány [53, 54, 55].

3.3.5 *Laurus nobilis* L.

vavřín ušlechtilý (Lauraceae)

Vždyzelená dřevina. Listy jsou lesklé, střídavé, podlouhlé. Známý jako koření bobkový list. Plodem je bobule. Charakteristickým sekundárním metabolitem je silice [42].

V lidovém léčitelství jsou listy využívány ke zlepšení koncentrace a jako antirevmatikum.

V roce 2010 proběhla studie, která testovala neuroprotektivní účinky spirafolidu, sloučeniny izolované z listů rostliny, proti dopamin (DA) indukované apoptóze v lidských neuroblastomech SH – SY5Y buněk. Došlo k poklesu intracelulární hladiny volných kyslíkových radikálů. Tyto reaktivní formy kyslíku jsou důležitými mediátory v mnoha neurodegenerativních onemocněních, včetně Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Tyto výsledky ukazují, že spirafolid má neuroprotektivní účinky proti DA toxicitě a mohou přispět k terapii neurodegenerativních chorob [56].

Neuroprotektivní a antiamyloidogenní aktivita využitelné v ovlivnění AD byla sledována u flavonoidů v listech vavřínu [95].

3.3.6 *Lycopodium clavatum* L.

plavuň vidlačka (Lycopodiaceae)



Obrázek č. 8: Habitus plavuně vidlačky [96]

Chráněna stále zelená výtrusná rostlina, rozšířena po celém světě mimo Středomořských oblastí. Lodyha plazivá i přes 1 m dlouhá, vidličnatě rozvětvená. V dolní části lodyhy hustě olistěna v horní řidčeji. Listy jsou drobné, jehlicovité, kopinaté, zakončeny bělavou vláskovitou osinkou. Výtrusnice, v níž vznikají drobné výtrusy (Sporae lycopodii), nesou obvykle dva stopkovité, dlouhé protáhlé klasy.

Spory obsahují vysoké procento mastného oleje, dále pryskyřici, stopy alkaloidů, sporonin, – polymerní terpen, způsobující nesmočitenost rostliny [57], odtud vznik názvu plavuň. Další alkaloidy jsou: lykopodin, klavatin, klavatoxin, lykoflexin, lykoklavin [58, 59, 60].

Lycopodiové alkaloidy se dělí na 4 hlavní skupiny: lykopodinovou, lykodinovou, fawcettiminovou a smíšenou [62]. Mezi lykodinové alkaloidy patří i huperzin A [63].

V lidovém léčitelství se užívají hlavně výtrusy ve formě prášku a odvaru per os při onemocnění jater, urogenitálního aparátu, zevně ve formě zásypu v terapii kožních chorob jako adstringens, antiglogistikum. Nať se pro svou toxicitu užívá zejména zevně, per os jen v omezeném množství, např. při astmatu či nádorových onemocnění [61].

3.3.7 *Magnolia officinalis* Rehder & E.H.Wilson

šácholan lékařský (Magnoliaceae)

Opadavý strom dorůstající až 20 m. Květy výrazné, jednotlivé, bílé až 15 cm velké, silně aromatické.

Listy jsou vejčitého tvaru, hladké lesklé.

U nás pěstován jako okrasná dřevina, v Číně a Japonsku jako součást tradiční i oficiální medicíny pro své antioxidantní, neuroprotektivní a protizánětlivé vlastnosti. Hlavními sekundárními látkami jsou alkaloidy, glykosidy, třísloviny a vonné silice [42].

Charakteristickými metabolity jsou deriváty fenolu odvozené z bifenyly. Největší podíl alkaloidů obsahuje kůra. U alkaloidů iriodeninu, anonainu, roemerinu, lysikaminu, magnoflorinu a magnokurarinu byla potvrzena inhibiční aktivita vůči α -glykosidase. Nejvyšší aktivitu vykazovali anonain a magnokurarin. Tyto alkaloidy by mohly být použity jako inhibitory α -glykosidasy v léčbě diabetu [64, 65].

V roce 2012 se uskutečnila studie vlivu obsahových látek *Magnolia officinalis* na paměťové dysfunkce a amyloidogenezi v transgenním myším modelu AD. Ukázalo se, že ethanolový extrakt *M. officinalis* účinně zabránil zhoršení paměti přes down-regulaci β -sekretasy [66].

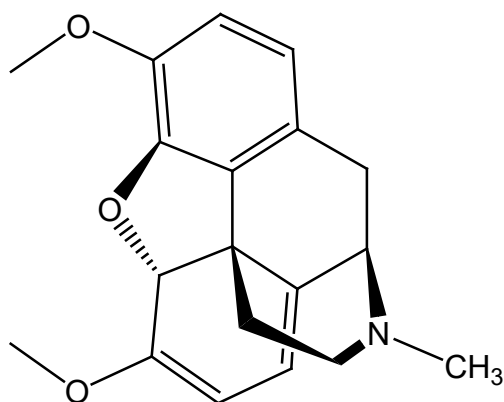
3.3.8 *Papaver orientale* L.

mák východní (Papaveraceae)

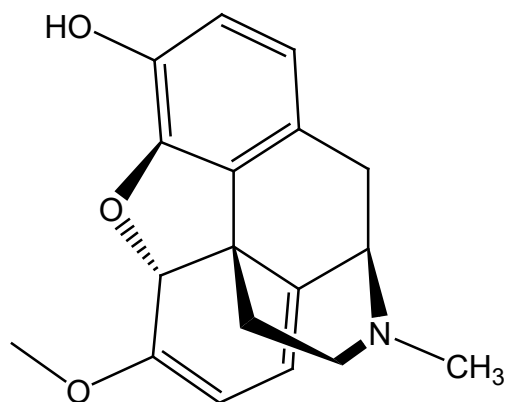
Mák východní patří mezi tzv. thebainové máky nevytvářející morfin.

Vytrvalá rostlina s mléčnicemi, květy jednotlivé, oranžově zbarvené. Semeník tvoří pouzdro. Celé tělo pokrývají štětiny. Plodem je tobolka s mnoha semeny, jež obsahují značné množství oleje [42]. Hlavní alkaloidy náleží do isochinolinové skupiny (oripavin, thebain, orientalidin, brakteolin, alpinigenin, salutaridin aj.) [67]. Thebain vykazuje velmi nízký anticholinesterasový i analgetický účinek. Proto se s ním v terapeutické praxi nepočítá.

Díky absenci morfinu a tedy znemožnění zneužití opia, se thebainové máky dostávají do popředí zájmu farmaceutického průmyslu. Thebain lze využít jako výchozí surovinu pro přípravu polosyntetických opioidních analgetik a tak se stává velmi žádanou substancí. Nejnovější studie jsou zaměřeny i na alkaloid oripavin a nově detekovaný oripavidin nacházející se v latexu i květech *Papaver orientale* L., jako další zdroje opioidních analgetik.



Obrázek č. 9: Thebain



Obrázek č. 10: Oripavin

3.3.9 *Papaver somniferum* L.

mák setý (Papaveraceae)

Jednoletá až 1,5 m vysoká rostlina, stonek zelenomodře zbarven. Listy jsou zubaté, zvlňené, podlouhlé. Květy jednotlivé, barevně rozmanité, oboupohlavné. Kališní lístky opadavé, korunní uspořádány ve dvou kruzích. Blizna přisedlá k pestíku. Semeník ze dvou a více plodolistů. Plodem je tobolka. Semena bohatá na olej. Velký počet tyčinek [42]. Využíván v potravinářském (odrůdy s vysokým obsahem oleje v semenech a min. obsahem morfinu) a farmaceutickém průmyslu. Celé bylina je protkána cévními svazky s mléčnicemi, produkující mléčnou tekutinu – latex. Nejvíce mléčnic se nachází v právě tobolkách neboli jinak řečeno v makovicích. Latex obsahuje řadu látek a sekundárních metabolitů rozmanitých

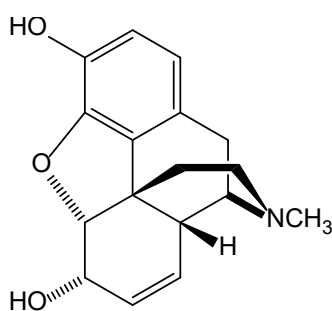
chemických struktur, kdy nejvýznamnější skupinou jsou alkaloidy odvozeny od isochinolinového heterocyklu. Tento soubor alkaloidů je označen jako opium (laudanum) [69]. V Českém lékopise 2009 uváděn *Opium crutum a opii pulvis normatum* jako surovina.

Opium bylo využíváno odnepaměti. Terapeuticky jako silné analgetikum k tišení nesnesitelných bolestí, ale také jako droga vyvolávající euforii a těžkou závislost bez znalostí obsahových látek. Do současnosti bylo identifikováno více než 50 různých alkaloidů tvořící opium. Jako první byl objeven v 19. století morfin, jeho chemická struktura byla zcela popsána až v roce 1952.

Mezi další již známé alkaloidy patří: kodein, tebain, neopin, pseudomorfin, oripavin (morfinanový typ), papaverin, retikulin, laudanin, noskabin, laudanosin (benzylisochinolinový typ), berberin (berberinový typ), somniferin (protoberberinový typ), protopin, kryptopin (protopinový typ), narkotin (ftalidisochinolinový typ), magnoflorin, luciferin (aporfínový typ) a mnoho dalších např. rhoedin, kodamin, braktein aj. [70]. Obsah alkaloidů v makovicích se mění během dne - nejvíce ráno a procentuální obsah specifických alkaloidů je závislý i na poddruhu máku. Existují dva postupy získávání opia. Z nezralých makovic, které se cíleně nařezávají a roní bílý latex, který se po zaschnutí a zhnědnutí sbírá [71]. U nás se využívá tzv. makovina (makovice se stonkem, stonk pod tobolkou do 15 cm dlouhý) nebo tzv. maková sláma (celé rostliny kromě kořenů a semen) [72].

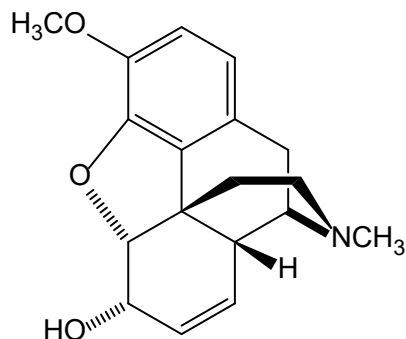
Majoritní zástupci v opiu: **Morfin** – anodynum, do současnosti nejsilnější rostlinné analgetikum. Schopnost imitace aktivace descendentní nociceptní soustavy uvolňující endogenní opioidy, ty společně s morfinem inhibují neurotransmiter bolesti (substanci P) a následně zabraňují přenos impulzu bolesti. V praxi k terapii silné až nesnesitelné bolesti. Zneužíván k výrobě nelegálních návykových látek např. heroin.

Opium, izolované alkaloidy (morfin, thebain, kodein), pěstování máku setého i manipulace s makovinou je ošetřeno zákonem č. 167/1998 Sb., o návykových látkách.



Obrázek č. 11: Morfin

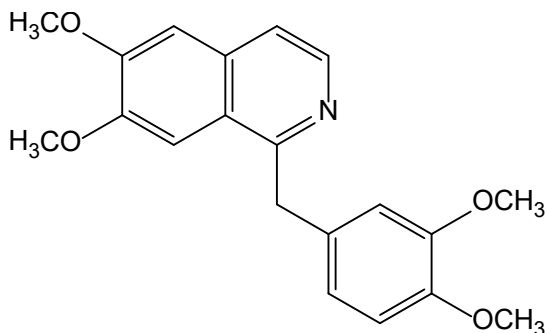
Kodein – vzniká metylací morfinu, mnohem slabší analgetický i návykový efekt na organismus. V praxi používán hlavně jako antitusikum a k tišení mírné až střední bolesti, většinou v kombinaci s analgetikem neoplodní povahy [73].



Obrázek č. 12: Thebain

Tebain – prekursor morfinu, možná výchozí surovina pro získání polysyntetických porodních léčiv.

Papaverin – muskulotropní spasmolytikum s „chinidinovým“ účinkem na myokard, na rozdíl od morfinu bez centrálních účinků. Možné uplatnění při léčbě cerebrálních vasospasmů. Dnes připravován synteticky [74].



Obrázek č. 13: Papaverin

Narkotin – neboli noskabin, postrádá analgetický i narkotický účinek.

Tlumí centrum kašle, a proto je v některých zemích užíván jako antitusikum. Při velmi nízkých dávkách má excitační vliv na dechové centrum, proto se doporučuje pacientům, kterým je podáván morfin. Snižuje se tak riziko útlumu dechu [75].

U papaverinu, berberinu, thebainu, narkotinu a dalších alkaloidů isochinolinové struktury byla objevena anticholinesterasová aktivita. Proto je i tento typ alkaloidů podrobován vědeckému studiu a hledání nové efektivní substance v boji s AD a jinými neurodegenerativními chorobami.

3.3.10 *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC.

řemdihák plstnatý (Rubiaceae)



Obrázek č. 14: Zahnuté trny na bázi listů vilkakory [97]

Synonyma: Vilkakora; Kočičí dráp, Uña de Gato

Popínavá rostlina Amazonie a středoamerických deštných pralesů. Listy vejcovité, celistvé. Květy mnohočetné oranžově zbarvené. Pod každým párem listů rostou trny ve tvaru drápu, které umožňují pevněji obepínat jiné rostliny. Stonek zdřevnatělý. Pro své nevídané léčebné účinky byla Inky považována za svatou bylinu. Její popularita je dnes celosvětová. Druh obsahuje přibližně 60 terapeuticky významných látek, které jsou v různých fázích biochemických a lékařských výzkumů nejen v Peru [83].

Mezi hlavní zástupce jsou indolové alkaloidy obsaženy majoritně v kůře (pteropodin, isopteropodin, neopterin, mirtafylin, isopteropodin, speciophyllin, rhynchofylin aj.)

U pteropodinu byly potvrzeny antioxidační, protizánětlivé, cytotoxické, antimutagenní a imunomodulační účinky [84, 85, 86, 87], dále se jeví jako modulátor muskarinového receptoru M₁ a 5HT₂ receptor pro serotonin [88]. Klinické studie *in vivo* tak *in vitro* potvrdily schopnost těchto indolových alkaloidů inhibovat proliferaci nádorových buněk některých typů tumorů a inhibovat nežádoucí aktivitu lymfocytů u pacientů s HIV [89, 90].

Pentacyklický oxindolový alkaloid vilkakory se váže na β -amyloid 1-40 a tím by mohl snížit agregaci tohoto proteinu a zároveň jeho toxicitu v rámci patofyziologie AD [98].

Specifický extrakt vilkakory (jednou shlavních obsahových látek byl identifikován proantokyanidin B2) má schopnost předcházet formaci filament τ -proteinu (a tím tvorbě neuronálních klubek) a agregace β -amyloidu (1–42 a 1–40) do fibril; nebo oba typy filament a agregátů desintegrovat. *In vivo* extrakt výrazně snížil množství senilních plaků a zlepšil krátkodobou paměť u transgenních myší (model londýnské a švédské mutace AD). Proantokyanidin B2 také snižuje zánětlivou reakci v mozku, které bylo prokázáno snížením astrocytózy a gliózy u transgenních myší T ASD-41. Zároveň byla na krysách sledována a potvrzena schopnost hlavních obsahových látek překonat hematoencefalickou bariéru. Objev těchto účinků vilkakory je pokládán za potenciální průlom pro ovlivnění normálního stárnutí mozku i změn při AD[99]

Uncaria tomentosa se v posledních desítkách let stala jednou z nejvíce žádaných rostlin světa. Její použití už zdaleka není jen v tradiční peruánské medicíně, dnes se dostává do popředí i medicíny oficiální.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a vybavení

4.1.1 Rozpouštědla

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a. (Penta); EtOH

Ethyl acetát, p.a. (Penta), EtOAc

Diethylether, p.a. (Penta); Et₂O

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich), DMSO

Voda čištěná (Millipore)

4.1.2 Chemikálie

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan sodný, p.a. (Lachema)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, ≥ 98% (Sigma-Aldrich); DTNB

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

Dusičnan bismutitý zásaditý, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Eserin (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc.)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co.)

Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice)

Jodid draselný, p.a. (Penta)

Kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lachema)

Kyselina vinná, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Uhličitan sodný bezvodý, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

4.1.3 Přístroje a programy

Přístroj použitý pro stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

Program GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA)

Odstředivka Avanti J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)

Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)

pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)

4.1.4 Materiál

Jako zdroj AChE byla použita lidská erythrocytární pouzdra. Jako zdroj BuChE byla použita lidská plazma; měření bylo provedeno v mikrotitračních destičkách.

4.1.4.1 Pomocný materiál

Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha)

Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)

Síran sodný bezvodý p. A. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na₂SO₄)

4.1.5 Detekční činidla

4.1.5.1 Dragendorffovo činidlo

Zásobní roztok Dragendorffova činidla byl připraven smícháním roztoku 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého přidaného do roztoku 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody) a roztoku 32 g KI v 80 ml vody). Vlastní detekční činidlo bylo připraveno přidáním 50 ml roztoku 20% kyseliny vinné k 5 ml zásobního roztoku. Oba typy roztoků (zásobní a k postřiku) byly uchovávány v chladu při 4 °C.

4.1.5.2 Mayerovo činidlo

Mayerovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g chloridu rtuťnatého v prášku. Vzniklá sraženina byla míchána, dokud nebyl roztok čirý a bezbarvý nebo světle žluté barvy. Činidlo bylo uchováváno v chladu při 4 °C.

4.1.6 Rostlinný materiál

Ověření totožnosti rostlin a rostl. drog byla prováděna Prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Dokladné vzorky drog jsou uloženy pod příslušným označením na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, UK.

Tabulka č. 1: Označení, původ a hmotnost jednotlivých rostlinných drog pro screening

Označení	Rostlinná droga	Místo sběru/dodavatel	Datum sběru	Hmotnost*
AL 14	<i>Papaver somniferum</i> - nezralé tobolky	- ZLR FaF -2 dny při 50 °C	08-07-08	47g
AL 15	<i>Euonymus europeus</i> - plod	Velký Grunov	09-10-02	32g
AL 25	<i>Papaver orientale</i> - list	Lindava	08-07-06	8g
AL 35	<i>Magnolia officinalis</i> - listy	Lindava	09-07-18	18g
AL 36	<i>Lycopodium clavatum</i> - nat'	Řídká Blaná /Olešník	09-07-25	24g
AL 39	<i>Laurus nobilis</i> - list	Lindava	09-09-03	33g
AL 49	<i>Fritillaria imperialis</i> - cibule	Lindava	10-04-25	13g
AL 103	<i>Flueggea suffruticosa</i> - nat'	Pragon	2008	4g
AL 107	<i>Uncaria tomentosa</i> - kůra	Oxalis	2006	46g
AL 197	<i>Evolvulus alsinoides</i> - nat'	Avicenna, Praha	01-10-12	102 g

4.2 Všeobecné postupy

4.2.1 Destilace a odpařování

Před použitím byla rozpouštědla (diethylether, ethanol, ethyl acetát) predestilována destilací podle tabelární teploty varu přečišťovaného rozpouštědla. Nejprve byla zachycena první část destilátu (většinou do 5 % celkového objemu; většinou vodný azeotrop), následně byl vydestilován zbytek rozpouštědla; ca 90 %. Rozpouštědla byla uložena do hnědých skleněných nádob.

Odpařování bylo prováděno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 s vodní lázni Büchi Waterbath B-480 při ca 40 °C za sníženého tlaku nebo na vodní lázni při teplotě 90-100 °C za odfoukávání par vzduchovacím motorkem.

4.2.2 Filtrace

Pro základní filtraci sumárních ethanolových extraktů drog byl používán vlizelin, který byl složený v nálevce; pro následnou filtraci spojených sumárních extraktů nebo okyselených extraktů byl použit eluční sloupec s vatou a s ca 3cm vrstvou křemeliny.

Po sušení alkaloidních roztoků síranem sodným bezvodým byly suspenze filtrovány přes filtrační papír.

4.2.3 Příprava sumárních a alkaloidních extraktů rostlinných drog

Příprava ethanolového sumárního extraktu rostlinné části byla zajištěna 30min varem na vodní lázni pod zpětným chladičem 95% ethanolom v poměru 9:1 (v/w). Po dekantaci a filtraci byl rost. vzorek vrácen zpět do baňky pro opakovanou extrakci. Získané ethanolové extrakty byly spojeny, přefiltrovány a ethanol odpařen na vakuové odparce za sníženého tlaku. K zahuštěnému extraktu bylo přidána 5% HCl a voda, v množství nutné pro dosažení pH 1. Tato směs byla opět zfiltrována a vzniklý roztok extrahován Et₂O (2× objemem 1:3 vůči V vytřepávaného roztoku) pro odstranění tuků a lipofilních látek nealkaloidního typu. Et₂O výtřepky byly zkontrolovány na přítomnost alkaloidů zakoncentrováním malého množství Et₂O výtřepku, aplikaci na TLC desku a detekcí Dragendorffovým činidlem. Vodný roztok byl dále alkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a extrahován EtOAc 3× objemem 1:3 vůči V vytřepávaného roztoku. Spojené EtOAc roztoky byly vysušeny přidáním bezvodého Na₂SO₄, následně (po 1 h sušení) zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku.

4.2.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči cholinesterasám

Měření byla provedena při teplotě 37 °C v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4) při $\lambda = 436$ nm v mikrotitračních destičkách.

4.2.4.1 Příprava zdrojů lidských cholinesteras

Erytrocytární pouzdra (zdroj AChE) byla připravena z čerstvě odebrané lidské krve, ke které byl přidán roztok citrátu sodného (1 ml citrátu sodného na 10 ml krve) podle lehce upravené metody Stecka a Kanta.

Plazma (zdroj HuBuChE) byla oddělena z krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a 3× promývány 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) obsahujícím 150 mM NaCl (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté červené krvinky byly smíseny s 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) a 10 min míchány, čímž došlo k jejich lýze. Potom byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a odseparovaná pouzdra byla 3× promývána fosfátovým pufrém.

4.2.4.2 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

Pro stanovení hodnoty IC_{50} (koncentrace potřebná pro 50% inhibici enzymu) byla použita upravená Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím DTNB. Jako substráty byly použity acetyl- a burylestery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovována je thiolová skupina thiocholinu, kdy po vazbě na DTNB vzniká žlutý produkt, který je stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sledován byl nárůst absorbance A za 1 min. Hodnoty IC_{50} byly počítány z naměřených hodnot poklesu aktivity HuAChE nebo HuBuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism. Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} standardních inhibitorů cholinesteras: galanthamin ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 1,71 \pm 0,065 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzin A ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ HuBuChE}} > 1000 \mu\text{M}$), eserinem ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$). I (inhibice) byla počítána podle vzorce:

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

ΔA_{Bl} = nárůst A slepého vzorku ("blank"); ΔA_{Sa} = nárůst A vzorku ("sample").

5 VÝSLEDKY

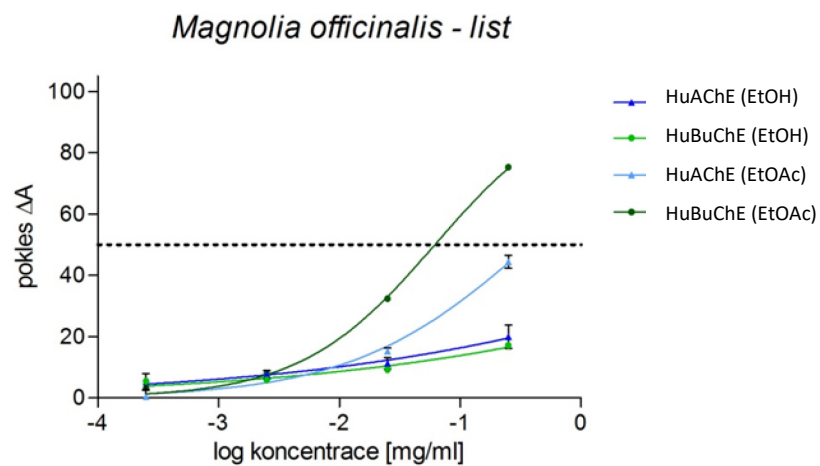
V níže uvedené tabulce č. 2 jsou uvedeny hodnoty IC_{50} vůči lidským cholinesterasám EtOH (sumárních) a EtOAc (alkaloidních) extraktů studovaných rostlinných drog. Rovněž je možné provnaty grafy získané ze stanovení aktivity vyjadřující pokles A při různých koncentracích extraktů.

Pro porovnání aktivity jsou v tabulce uvedeny hodnoty IC_{50} známých IChE, a to jednotkách μM i v $\mu g/ml$ pro snadnější porovnání aktivity.

Tabulka č. 2: Inhibiční aktivita extraktů rostlinných drog vůči lidským cholinesterasám

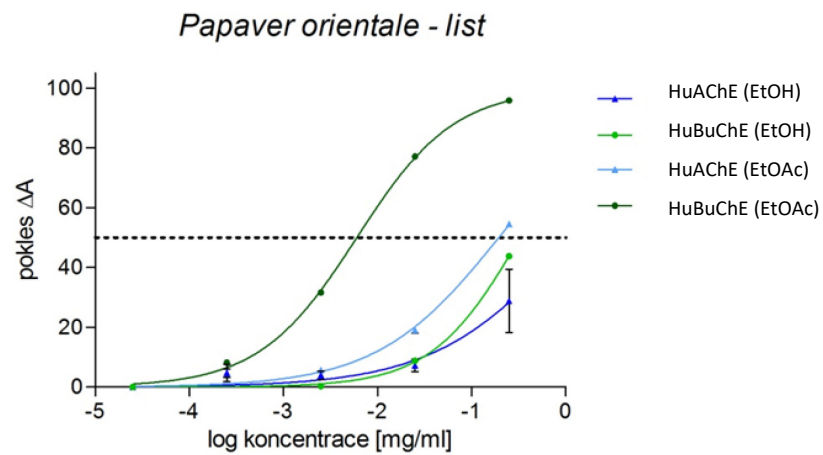
Ozn.	R.d.	EtOH		EtOAc		Graf
		IC ₅₀ µg/ml				
		HuAChE	HuBuChE	HuAChE	HuBuChE	
AL 49	<i>Fritillaria imperialis</i> - cibule	161,5	65,41	102,0	11,39	<p><i>Fritillaria imperialis</i> - cibule</p>

AL 35	<i>Magnolia officinalis</i> - listy	> 250	> 250	> 250	61,81
-------	-------------------------------------	-------	-------	-------	-------



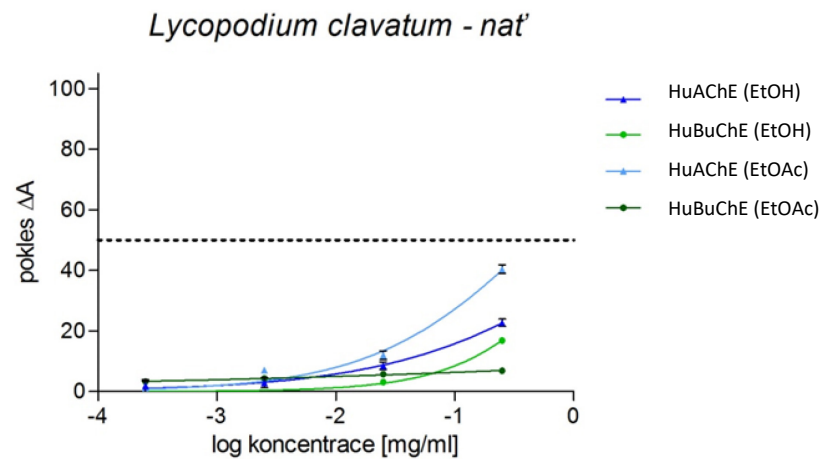
Ozn.	R.d.	EtOH		EtOAc	
		IC ₅₀ μg/ml			
		HuAChE	HuBuChE	HuAChE	HuBuChE

AL 25	<i>Papaver orientale</i> - list	> 250	> 250	195,00	6,03
-------	---------------------------------	-------	-------	--------	------



Lycopodium clavatum - nat'

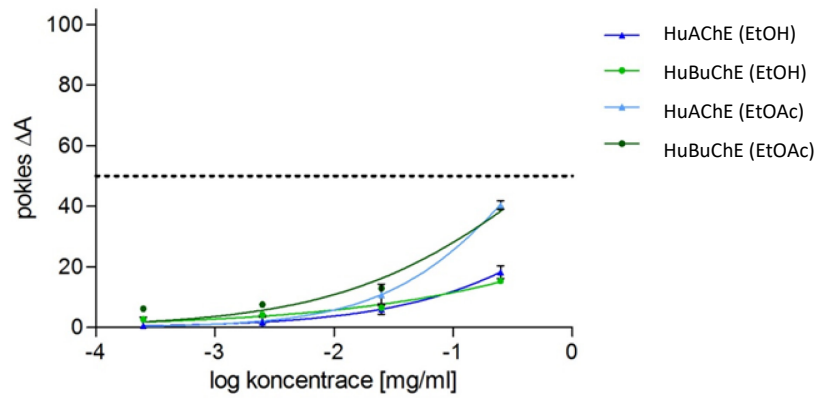
AL 36 > 250 > 250 > 250 > 250



Ozn.	R.d.	EtOH		EtOAc		Graf
		IC ₅₀ µg/ml				
		HuAChE	HuBuChE	HuAChE	HuBuChE	
AL 36		> 250	> 250	> 250	> 250	

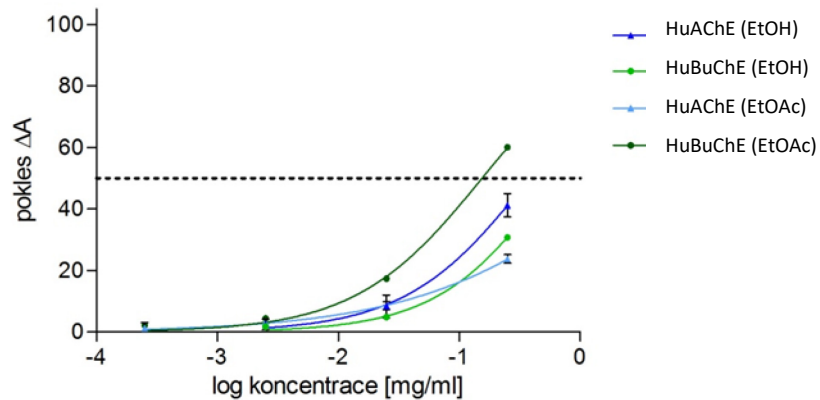
AL 39	<i>Laurus nobilis</i> - list	> 250	> 250	> 250	> 250
-------	------------------------------	-------	-------	-------	-------

Laurus nobilis - list



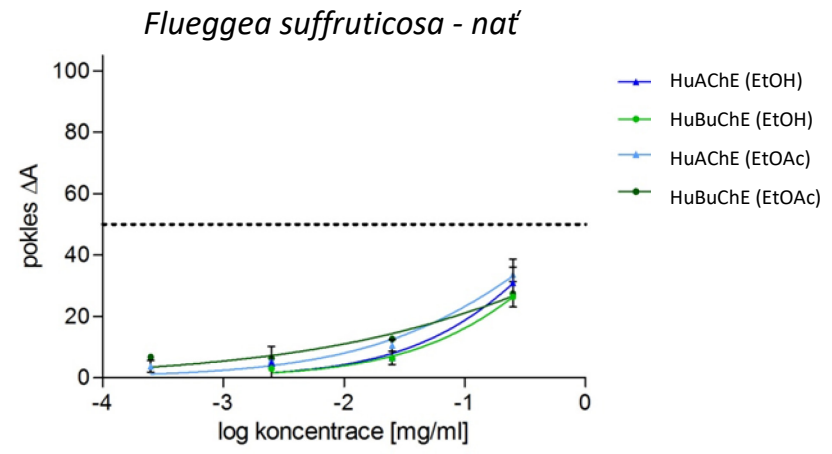
AL 107	<i>Uncaria tomentosa</i> - kůra	> 250	> 250	> 250	154,7
--------	---------------------------------	-------	-------	-------	-------

Uncaria tomentosa - kůra

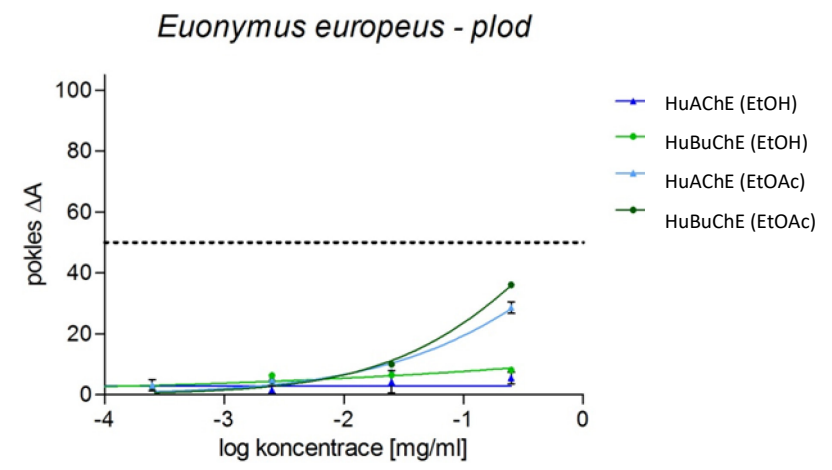


Ozn.	R.d.	EtOH		EtOAc		Graf
		HuAChE	HuBuChE	HuAChE	HuBuChE	
		IC ₅₀ μg/ml				

AL 103	<i>Flueggea suffruticosa - nat'</i>	> 250	> 250	> 250	> 250
--------	-------------------------------------	-------	-------	-------	-------



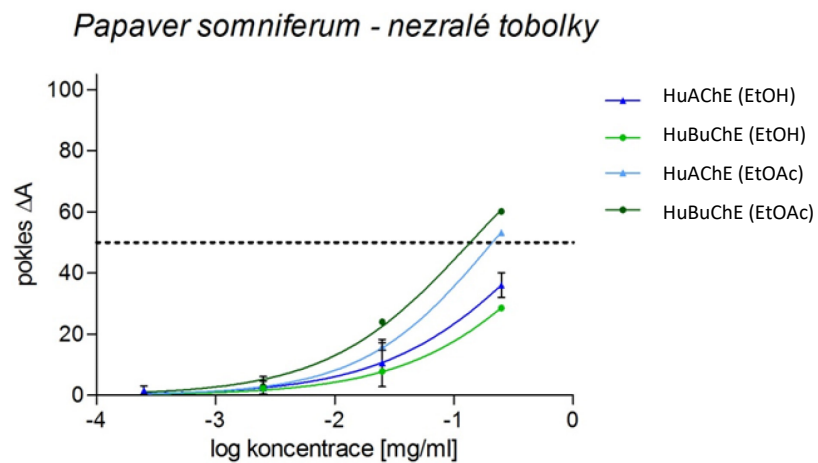
AL 15	<i>Euonymus europaeus- plod</i>	> 250	> 250	> 250	> 250
-------	---------------------------------	-------	-------	-------	-------



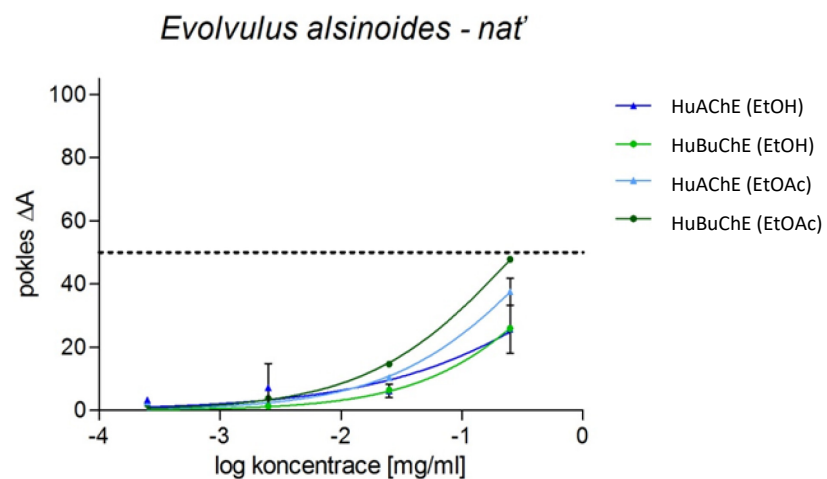
Ozn.	R.d.	EtOH	EtOAc	Graf
------	------	------	-------	------

		IC ₅₀ µg/ml		
	HuAChE	HuBuChE	HuAChE	HuBuChE

AL 14	<i>Papaver somniferum</i> - nezralé tobolky	> 250	> 250	210,9	137,0
-------	---	-------	-------	-------	-------



AL 197	<i>Evolvulus alsinoides</i> - nat'	> 250	> 250	> 250	> 250
--------	------------------------------------	-------	-------	-------	-------



Oranžově jsou označeny významné hodnoty $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$

Tabulka č. 3: Inhibiční aktivita standardů vůči lidským cholinesterasam

Látka	$IC_{50} \mu\text{M}$		$IC_{50} \mu\text{g/ml}$	
	HuAChE	HuBuChE	HuAChE	HuAChE
Eserin	0,063	0,13	0,017±0,001	0,036±0,001
Huperzin A	0,033	>1000	0,008±0,001	>1000
Galanthamin	1,714	42,03	0,491±0,019	12,155±0,374

6 DISKUZE

Významná aktivita byla sledována pouze vůči HuBuChE u dvou rostlinných drog.

Listy *Papaver orientale* je možné považovat za zdroj potenciálních inhibitorů HuBuChE s hodnotami $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$. Na rozdíl v aktivitách vůči HuBuChE mezi ethanolovým a ethylacetátovým extraktem lze vidět, že za sledovanou aktivitou budou patrně odpovědné alkaloidy. V literatuře nejsou dostupné žádné informace o dřívějším sledování anticholinesterasového účinku extraktů *Papaver orientale*, se kterými by mohly výsledky porovnány.

Fritillaria imperialis – cibule – je patrné, že přípravou alkaloidního ethylacetátového extraktu dochází ke zvýšení aktivity, třebaže není natolik významná u HuAChE $IC_{50 \text{ EtOH}} = 161,5 \mu\text{g/ml} \rightarrow IC_{50 \text{ EtOAc}} = 65,41 \mu\text{g/ml}$ jako u HuBuChE $IC_{50 \text{ EtOH}} = 102,0 \mu\text{g/ml} \rightarrow IC_{50 \text{ EtOAc}} = 11,39 \mu\text{g/ml}$. Z cibulí *Fritillaria imperialis* byly již dříve izolovány steroidní alkaloidy s významnou aktivitou vůči BuChE (Impericin, Delavin, Persikanidin A s hodnotami $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$), nicméně tato aktivita byla stanovena vůči BuChE z koňské plazmy [100].

Mezi alkaloidní extrakty s $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ vůči HuBuche patří ještě *Magnolia officinalis* – listy. V jiném druhu šácholanu – *Magnolia × soulangeana* byl nalezen alkaloid taspin s výraznou inhibiční aktivitou vůči AChE s hodnotou $IC_{50} = 0,33 \pm 0,07 \mu\text{M}$, nicméně i alkaloidní extrakt listů této pěstované odrůdy měl významně nižší hodnotu $IC_{50} 7,81 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$ než extrakt listů šácholanu lékařského v této práci, nicméně ve zmíněné studii byla použita AChE z elektrického úhoře [101].

Extrakty natí *Flueggea suffruticosa*, plodů *Euonymus europeus*, listů *Laurus nobilis*, natí *Lycopodium clavatum*, natí *Evolvulus alsinoides*, nezralých tobolek *Papaver somniferum* a kůry *Uncaria tomentosa* nelze pokládat za významně aktivní vůči lidským cholinesterasám $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$, byť mohou obsahové látky mít jiné neuroprotektivní účinky.

Anticholinesterasová aktivita látek či extraktů *Euonymus europeus*, *Flueggea suffruticosa* a *Uncaria tomentosa* dosud publikována nebyla.

Různé extrakty *Evolvulus alsinoides* (získané macerací v: *n*-hexanu, chloroformu, ethylacetátu, methanolu a vodě) již byly zkoumány z pohledu aktivity vůči AChE a tyto extrakty byly poměrně výrazně aktivní $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$, nicméně postup extrakce byl odlišný (nejen použitými rozpouštědly, ale i postupem extrakce či zdrojem AChE pro stanovení aktivity – elektrický úhoř) [102].

Nevýznamná inhibiční aktivita extraktů listů vavřínu vůči AChE byla již dříve sledována, což je v souladu s nynějšími výsledky [103].

V nati plavuně vidlačky byl dříve objeven kromě Huperzinu A ještě další silný inhibitor AChE – terpenoid α -onocerin [104], nicméně v této studii byl sumární i alkaloidní extrakt bez výrazné aktivity vůči cholinesterasám.

Zanedbatelná aktivita různých extraktů (vodný, methanolvý, ethylacetátový) *Papaver somniferum* byla sledována již dříve a nynější výsledky jsou v souladu s již publikovanými [105].

7 LITERATURA

1. Minařík, J.: *Farmakognosie*, str. 384, Avicenum, 1. vyd., Praha 1979.
2. Lincová, D., Farghali, H., et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, str. 144, Galén, 2. vyd., Praha 2007.
3. Jirák, R., Obenberger J., Preiss M.: *Alzheimerova choroba*. Maxdorf, Praha 1998.
4. <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2013>, staženo 22. Března 2014.
5. Holmerová, I.: Možnosti prevence kognitivní poruchy a demence. *Practicus*. 4, 21–22, 2011.
6. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A.: *Atlas farmakologie*, str. 184, Grada Publ., 1. vyd., Praha 1994.
7. Marek, J. a kol.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, str. 641, Grada Publ., 3. vyd., Praha 2005.
8. Perry, T. L., Hansen, S., Kloster, M.: Huntington's chorea: deficiency of gamma aminobutyric acid in brain. *New Engl. J. Med.* 288, 337–342, 1973.
9. Rektorová, I., Rektor, I. a kol.: *Centrální poruchy hybnosti v praxi*, str. 21–70, Triton 2003.
10. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. et al.: Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*. 95, 55–66, 1998.
11. Spokes, E. G. S.: Neurochemical alterations in Huntington's chorea. A study of *post mortem* brain tissue. *Brain*. 103, 179–210, 1980.
12. Moravcová, J.: Biologicky aktivní přírodní látky, str. 108, VŠCHT, Praha, 2006.
13. Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghorn, A. D.: Drug Discovery From Natural Sources. *AAPS J.* 8, 239 (2006).
14. Koulík, F., Jirák, R.: *Alzheimerove nemoc a další demence*. 1. vyd. Grada Publ., Praha 1998.
15. http://www.medical-academy.cz/cla/revue_1_2004.pdf
16. Jirák, R.: Farmakoterapie demencí. *Prakt. lékařství*. 4 (6), 286–290, 2008.
17. <http://www.healingwell.com/library/alzheimers/info2.asp>
18. <http://www.lf2.cuni.cz/info2lf/ustavy/nkd/pred/demence.pdf>
19. Jirák, R.: Kognitivní farmakoterapie Alzheimerovy choroby: Současný stav a vyhlídky do blízké budoucnosti. *Farmakoterapie* 6, 604–609, 2005.
20. Tilšer, I.: Léčba demencí (antidemecia, kognitiva) 2008. Přednášky z farmakologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 1. 10. 2008.
21. Amyloidní protein. Amyloidní prekurzorový protein. online cit. 2011-5-2.
Dostupné z: http://www.zbynekmlcoch.cz/inc_medic/amyloidni_protein.doc.
22. Jirák, R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie* 18, 212–214, (2004).

23. Jirák, R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi* 2, 101–105, (2004).
24. Zhang, R. W., Tang X. C., Han, Y. Y., Sang, G. W., Zhang, Y. D., Ma, X. Y.: *Acta Pharmacol. Sin.* 250 (1991)
25. Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc. *Solutio* 2000/2003, 21–28, (2002).
26. Patočka, J.: Semagacestat – nová cesta v terapii Alzheimerovy nemoci. *Psychiatrie* 13(1), 15–17, (2009).
27. Cibičková, L., Palička, V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. *Klin. Biochem. Metab.* 13(34), 127–130, (2005).
28. Patočka, J.: Jak může toxikologický výzkum mravenců nebo žab prospět psychiatrii? *Psychiatrie* 4(4), (2000).
29. Opletal, L., Opletalová, V.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu; Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv; Brno 12–14.9. 2005, 26, 2005.
30. Rogers, S. L., Farlow M. R., Doody R. S., Mohs R., Friedhoff L. T.: *Neurology* 50, 136-145, (1998).
31. Wang, R., Tang, X. C.: *Neurosignals* 14, 71, (2005).
32. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Praktické lékařství* 2011, 7(1), 39–41, (2011).
33. Lopes, C., Monteiro, E., Maier, J. A; Rogerio da Silva, M., Regasini, L. O., Simote S.Y., Lopes, N. P., Pirani, J. R., Vanderlan da Silva, B., Young, M. C. M.: Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules* 15, 9205-9213, (2010).
34. Cahlikova L., Opletal L., Kurfurst M., Macakova K., Kulhankova A., Host'alkova A.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Natural Product Communications*, 5(11), 1751-1754, (2010).
35. Xu, D., Zhou, Ch.: Antioxidative effects of berberine pre-treatment on hydrogen peroxide-induced PC12 cell toxicity. *Neural Regeneration Research*, 5(18), 1391-1395, (2010).
36. Skoumalová, A.: Periferní markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby. *Klin. Biochem. Metab.*, 19 (40), 218–222, (2011).
37. Hung, T M., Nguyen H. D., Kim, J. Ch., Jang, Han-Su., Ryoo, Sung-Woo., Lee, J. H., Choi, J. S., Bae, K. H., Min, B.: Alkaloids from roots of *Stephania rotunda* and their cholinesterase inhibitory activity. *Plant. Med.*, 76(15), 1762-1764, (2010).
38. Pereira, D. M., Ferreres, F., Oliviera, J. M. A., Gaspar, L., Faria, J., Valentao, P., Sottomayor, M., Andrade, P. B.: Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, 17(8-9), 646-652, (2010).

39. Fayed, Abdel-Hasseb A.: Brain Trace Element Concentration of Rats Treated with the Plant Alkaloid, Vincamine. *Biological Trace Element Research* 136(3), 314-319, (2010).
40. Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF- κ B as potential targets. *J Immunol.* 2005; 174:8116–24. [PubMed]
41. Wang, Y., Xia Z., Xu J. R., Wang, Y. X., Hou L. N., Qiu, Y., Chen, H. Z.: α -mangostin, a polyphenolic xanthone derivative from mangosteen, attenuates β -amyloid oligomers induced neurotoxicity by inhibiting amyloid aggregation. *Nemacologurophary* 62, 871 (2012).
42. Jahodář, L.: *Farmakobotanika – semenné rostliny*, Karolinum, Praha 2011.
43. Descoins, CH. Jr., Bazzocchi, Lopez, I., Ravelo, Gutierrez, A.: New sesquiterpenes from *Eonymus europaeus* (Celastraceae).
44. Bohinc, P., Colnaric, M.; Hidajat, S.; Primožic J: Xanthinic alkaloids of the pegwood-*Euonymus europaeus* L. *Farm. Vestnik (Ljubljana, Slovenia)* 27(3), 149-56, (1976).
45. Dubravkova, L.; Dolejs, Ladislav; Tomko, J.: Isoevonine a novel alkaloid from *Euonymus europaeus* containing wilfordic acid. *Collection of Czechoslovak Chem. Communications* 38(7), 2132-6, (1973).
46. Bishay, D. W., Kowalewski, Z., Phillipson, J. D.: Identification of peptide alkaloids from *Euonymus europaeus* (Celastraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 24,169, (1972).
47. Budzikiewicz, H., Roemer, A., Taraz, K.: 4-Deoxyevonine new alkaloid from *Euonymus*. *Zeitschrift fuer Naturforschung.* 27(7), 800-805, 1972).
48. Bishay, Daoud W., Kowalewski, Z.: Alkaloids of *Euonymus europaeus* growing in Poland. II. Alkaloids of leaves and seeds. *Herba Polonica* 17(3), 233-241, (1971).
49. Bishay, Daoud W., Kowalewski, Z.: Alkaloids of *Euonymus europaeus* growing in Poland. I. Alkaloids of the stem and root. *Polonica* 17(1-2), 97-109, (1971).
50. Nahata, A.: Effect of *Evolvulus alsinoides* Linn. on learning behavior and memory enhancement activity in rodents. *UK Patil, Phytotherapy Research* 24(4), 486–493, April (2010).
51. Sudhakumari, N. K., Aamir J., Manish, J., Muralidhar, S.: Cardioprotective Effects in Methanolic Extract of *Evolvulus Alsinoides* Linn on Isoproterenol - Induced Myocardial Infarction in Albino Rats. *IJBMS*. 53(2), 2049-4963, (2012).
52. Subramanian, N. K., et al.: Radical Scavenging Activity of *Evolvulus alsinoides* on Glutamate Induced Neurodegeneration. *IRJP* 2 (1), 169-174, (2011).
53. Cao, X., Chen, S. B., Li, J., Xiao, P. G. Ch.: Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria delavayi* Franch. (Liliaceae). *Shi-Lin. Biochem. Systematics and Ecology* 36(8), 665-668, (2008).
54. Lin, B. Q., Ji, H., Li, P., Jiang, Y., Fang, W.: Antagonism activity of alkaloids from bulbs *Fritillariae* at muscarinic receptors: Functional studies. *European Journal of Pharmacology* 551(1-3), 125-130, (2006).

55. Atta-ur-Rahman Akhtar, Nadeem, M., Iqbal, Ch. M., Yoshisuke, T., Bilge, S., Khalid, Assad K., Masood, P.: New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 50(8), 1013-1016, (2002).
56. Ham, A., Kim, B., Koo U., Nam, K. W., Lee, S. J., Kim, K. H., Shin, J., Mar, W.: Spirafolide from bay leaf (*Laurus nobilis*) prevents dopamine-induced apoptosis by decreasing reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Pharm. Res.* 33(12), 1953-1958, (2010)
57. Hron, F., Zejbrlík, O.: *Rostliny strání, skal, křovin a lesů: Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1990.*
58. Khomenok, V. S., Georgievskii, V. P.: Alkaloid content in *Lycopodium clavatum* grass *Rastitel'nye Resursy.* 10(3), 382-385, (1974).
59. Ayer, W. A., Fukazawa, Y., Singer, P. P., Altenkirk, B.: Lycoflexine, a new type of lycopodium alkaloid. *Tetrahedron Letters* (50), 5045-5048, (1973).
60. Rodewald, W. J., Gryniewicz, G.: Minor constituents of Lycopodium alkaloids. Chemical nature of clavatoxine and isolycopodine. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie des Sciences Chimiques* (1967), 15(12), 579-81, (1967).
61. Janča, J., Zentrich J. A.: *Herbář léčivých rostlin. č. 4, s. 287, Eminent, 1994.*
62. Ayer, W. A., Trifonov, L. S.: *Lycopodium Alkaloids.* Academic Press., San Diego 1994.
63. Bai, D. L.: *Pure Appl. Chem.* 79, 469 (2007).
64. Wang, M., Qu, Q., Yu, K.: Method for extracting total alkaloids of *Magnolia officinalis* for treating diabetes. *Faming Zhuanli Shenqing. ACS.* (2011).
65. Qu, Q., Zhu, Q., Yu, K., Wang, M.: Constituents with inhibitory activity against α -glycosidase from *Magnolia officinalis*. *Yingyong Yu Huanjing Shengwu Xuebao* 15(6), 796-79, (2009).
66. Lee, Y., Choi D. Y., Han, S. B., Kim, Y. H., Kim, K. H., Hwang B. Y., Kang J. K., Lee, B. J., Oh, KW, Hong J. T.: Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* on memory impairment and amyloidogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via regulating β -secretase activity. *Phytother Res.* 26(12):1884-92, (2012). Epub 2012.
67. Israilov, I. A.; Denisenko, O. N.; Yunusov, M. S.; Murav'eva, D. A.; Yunusov, S. Y.: Alkaloids from *Papaver orientale*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* (4), 474-475, (1978).
68. Carrol, R. J., Leisch, H., Hudlicky, T.: Conversion of thebain to morphine derivates. *PAT Appl. Publ.*, (2009).
69. Korbelář, J., Endris, Z., Krejča, J.: *Naše rostliny v lékařství*, s. 496, Avicenum, Praha, 1973.
70. Novák, J., Preininger, V.: *Taxonomické a fytochemické hodnocení rodu Papaver (Papaveraceae)*, s. 157, Vysoká škola zemědělská, Praha, 1981.
71. Jaroš, Z.: *Léčivé látky z rostlin*, Dona, České Budějovice, 1992, 79 s.
72. Vašák, J. (Ed.) et al., Mák, Powerprint, s. 336, Praha, 2010.
73. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie.* Grada Publ.,

15. vyd. Praha 2004.
74. Heffez, D. S.; Leong, Kam W.: Sustained release of papaverine for the treatment of cerebral vasospasm: *in vitro* evaluation of release kinetics and biological activity. *Neurosurgery*. 77(5), 783–787, (1992).
75. Prokeš, J. et al., *Základy toxikologie, Obecná toxikologie a ekotoxikologie*, s.248, Galén Karolinum, Praha, 2005.
76. Koblížek J.: *Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků*, s. 178, 2. vyd., Sursum, 2008.
77. Yuan, W., Zhu, P., Cheng, K., Meng, C., Wu, F., & Zhu, H.: *Natural Product Research*, 21, 234–242, (2007).
78. Raj, D., Łuczkiwicz, M.: *Fytoterapia*, 79, 419–427, (2008).
79. Zhang, W., Li, J., Lan, P., Sun, P., Wang, Y., Ye, W., & Chen, W.: *Journal of Chinese Pharmaceutical* (2011).
80. Rana, S., Gupta, K., Gomez, J., Matsuyama, S., Chakrabarti, A., Agarwal, M., Agarwal, A., Agarwal, M., Wald, D.: *FEBS Journal* 24, 2126–2134, (2010).
81. Xia, Y. H., Cheng, C. R., Yao, S. Y., Zhang, Q., Wang, Y., Ji, Z. N.: *Fytoterapia* 82, 1258–1264, (2011).
82. Hong, Y., Downey, T., Eu, K., Koh, P., & Cheah, P.: *Clinical and Experimental Metastasis*, 27, 83-90, (2010).
83. Gattuso, M.: *Botánica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad*, (2011).
84. Paradowska, K., Wolniak, M., Pisklak, M., Glinski, J. A., Davey, M. H., Wawer, I.: *13C, 15N CPMAS NMR and GIAO DFT calculations of stereoisomeric oxindole alkaloids from Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*)*. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 34(4), 202-209, (2008).
85. Laus, G., Wurst, K.: X-ray crystal structure analysis of oxindole alkaloids. *Helvetica Chem. Acta* 86(1), 181-187, (2003).
86. Huerta-Heredia, A. A., Marin-Lopez, R., Ponce-Noyola, T., Cerda-Garcia-Rojas, C. M., Trejo-Tapia, G., Ramos-Valdivia, A. C.: Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Engineering in Life Sciences* 9(3), 211-218, (2009).
87. Paniagua-Perez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Molina-Jasso, D., Reyes-Cadena, S., Alvarez-Gonzalez, I., Sanchez-Chapul, L., Perez-Gallaga, J.: Antigenotoxic, antioxidant and lymphocyte induction effects produced by pteropodine. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104(3), 222-227, (2009).
88. Kang, T. H., Matsumoto, K., Tohda, M., Murakami, Y., Takayama, H., Kitajima, M., Aimi, N., Watanabe, H.: Pteropodine and isopteropodine positively modulate the function of rat muscarinic M1 and 5-HT2 receptors expressed in *Xenopus*. *European Journal of Pharmacology* 444(1-2), 39-45, (2002).

89. Pilarski, R., Filip, B., Wietrzyk, J., Kuras, M., Gulewicz, K.: Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine* 17(14), 1133-1139, (2010).
90. Keplinger, K., Wurm, M., Laus, G.: Method and alkaloids for releasing a growth factor from endothelial cells. *PCT Int. Appl.* (1998).
91. <https://www.ireceptar.cz/zdravi/jedovate-dreviny-na-zahrade-buxus-a-brslen.html>
92. <http://www.jardimcor.com/catalogo-de-especies/evolvulus-glomeratus/>
93. http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=51313
94. <https://cz.depositphotos.com/263826608/stock-photo-crown-imperial-flowers-fritillaria-imperialis.html>
95. Pacifico S, Gallicchio M, Lorenz P, Duckstein SM, Potenza N, Galasso S, Marciano S, Fiorentino A, Stintzing FC, Monaco P. Neuroprotective potential of *Laurus nobilis* antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts. *Chem Res Toxicol.* 21-27(4), 611-626, (2014). Epub 2014.
96. http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Lycopodium%20clavatum&czName=plavu%C5%88%20vidla%C4%8Dka&title=Lycopodium%20clavatum%20%20plavu%C5%88%20vidla%C4%8Dka&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=cz
97. <http://www.bylinky21.eu/herbar/vilcacora-nezadouci-ucinky>
98. Frąckowiak T., Bączek T., Kaliszan R., Żbikowska B., Gleńsk M., Fecka I., Cisowski W. "Binding of an Oxindole Alkaloid from *Uncaria tomentosa* to Amyloid Protein (A β 1-40)" *Zeitschrift für Naturforschung C* 61(11-12), 821-826 (2006)
99. Snow, A.D., Castillo, G.M., Nguyen, B.P. et al. The Amazon rain forest plant *Uncaria tomentosa* (cat's claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles. *Sci Rep* 9, 561 (2019)
100. Akhtar A., Nadeem M., Iqbal CH.M., Yoshisuke T., Bilge S., Assad K., Masood A. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 50(8), 1013-1016, (2002), *Chem. Pharm. Bull.* 50(8), 1013—1016 (2002)
- Rollinger, J. M., Schuster, D., Baier, E., Ellmerer, E. P., Langer, T., & Stuppner, H.
101. Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Magnolia x soulangiana*. *Journal of natural products*, 69(9)
102. Mettupalayam Kaliyannan Sundaramoorthy, P., & Kilavan Packiam, K. In vitro enzyme inhibitory and cytotoxic studies with *Evolvulus alsinoides* (Linn.) Linn. Leaf extract: a plant from Ayurveda recognized as Dasapushpam for the management of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 129, (2020)

103. Ferreira A., Proenca C., Serralheiro M. L., Araujo M. E. M.: The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. 108(1), 31-7, (2006)
104. Rollinger JM., Ewelt J., Seger C., Sturm S, Ellmerer E.P., Stuppner H. New insights into the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.* 71(11), 1040-3, (2005)
105. Kirkan, B., Ozer, M.S., Sarikurkcü, C., Copuroglu, M.; Cengiz, M., Tepe, B. Can the stalks of *Papaver somniferum* L. be an alternative source of bioactive components. *Ind. Crops Prod.* 115, 1–5, (2018)

8 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Autor: **Mgr. Ivana Valentová**

Školitel: **Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Název rigorózní práce: **Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Screening alkaloidních rostlin na anticholinesterásový účinek**

Klíčová slova: inhibice cholinesteras, Alzheimerova choroba, rostlinný extrakt

Deset rostlin vybráno pro screening aktivity inhibice cholinesterasy při hledání nových látek pro ovlivnění Alzheimerovy choroby. Tyto rostliny jsou tradičně používány pro fytoterapii různých onemocnění a mohly by být zdrojem nových přírodních látek s léčebným potenciálem. Z tohoto důvodu byly připraveny jejich ethanolové a alkaloidní extrakty, u kterých byla stanovena jejich schopnost inhibovat lidské cholinesterasy. Pro extrakci byly vybrány konkrétně nezralé tobolky *Papaver somniferum*, plody *Euonymus europaeus*, listy *Papaver orientale*, listy *Magnolia officinalis*, nať *Lycopodium clavatum*, listy *Laurus nobilis*, cibule *Fritillaria imperialis*, nať *Flueggea suffruticosa*, kůra *Uncaria tomentosa* a nať *Evolvulus alsinoides*.

Pro stanovení inhibiční aktivity lidské cholinesteras byla použita *in vitro* modifikovaná Ellmanova metoda. Pouze dva alkaloidní rostlinné extrakty lze považovat za potenciální zdroj inhibitorů HuBuChE; žádný z extraktů významně neinhiboval AChE. Alkaloidní extrakt z listů *Papaver orientale* byl nejsilnějším inhibitorem HuBuChE s hodnotou IC_{50} 6,03 $\mu\text{g/ml}$, alkaloidní extrakt z cibulí *Fritillaria imperialis* také významně inhiboval HuBuChE s hodnotami IC_{50} 11,39 $\mu\text{g/ml}$. Ostatní extrakty byly považovány za neaktivní ($IC_{50} \geq 100 \mu\text{g/ml}$). Žádný z extraktů však nebyl srovnatelně aktivní v porovnání s použitými standardy.

9 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: **Mgr Ivana Valentová**

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

Title of Rigorous Thesis: **Natural substances and their biological activity. Screening of alkaloid plants on human cholinesterases inhibition**

Key words: cholinesterase inhibition, Alzheimer disease, plant extract

Ten herbs were screened for cholinesterase inhibition activity within searching new anti-Alzheimer agent. These plants are traditionally used as herbal remedies for various diseases and they could be sources of new potential natural compounds. For this reason, ethanolic and alkaloidal extracts plants were prepared and their ability to inhibit human cholinesterases inhibition was determined. For the extraction *Papaver somniferum* immature capsules, *Euonymus europaeus* fruits, *Papaver orientale* leaves, *Magnolia officinalis* leaves, *Lycopodium clavatum* aerial parts, *Laurus nobilis* leaves, *Fritillaria imperialis* bulbs, *Flueggea suffruticosa* aerial parts, *Uncaria tomentosa* bark, and *Evolvulus alsinoides* aerial parts were chosen.

For the determination of human cholinesterase inhibitory activity *in vitro* modified Ellman's method was used. Only two alkaloidal plant extracts could be considered as potential source of HuBuChE inhibitors; any of extract inhibited AChE significantly. *Papaver orientale* leaves alkaloidal extract was the strongest inhibitor of HuBuChE with IC₅₀ value of 6,03 µg/ml, alkaloidal extract of *Fritillaria imperialis* bulbs also significantly inhibited HuBuChE with IC₅₀ values 11,39 µg/ml. Other extracts were considered inactive (IC₅₀ ≥ 100 µg/ml). Any of extracts did not reached activity of used standards.