UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

Mgr. ZUZANA KRŠKOVÁ

INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTŮ Z *FONTINALIS ANTIPYRETICA* A β-KARBOLÍNOVÝCH ALKALOIDŮ NA ACETYLCHOLINESTERASU A BUTYRYLCHOLINESTERASU

Dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Hradec Králové 2010

Děkuji Doc. RNDr. Jaroslavu Duškovi, CSc. a Pharm.Dr. Janu Martinovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a vstřícnost během mého postgraduálního studia na katedře Farmakognosie. Děkuji také všem ostatním členům katedry za ochotu kdykoliv poradit a pomoci a za příjemnou pracovní atmosféru.

Dále děkuji SVV-2010-261-002 a výzkumnému záměru MSM0021620822 za finanční podporu.

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

Zuzana Kršková

OBSAH

1.	**ÚVOD**	**7**
2.	**CÍL**	**8**
3.	**TEORETICKÁ ČÁST**	**9**
3. 1.	Popis rostliny *Fontinalis antipyretica*	9
3. 2.	Využití *Fontinalis antipyretica*	10
3. 3.	Obsahové látky rodu *Fontinalis*	10
3. 4.	Biologické účinky *Fontinalis antipyretica*	12
3. 5.	β-karbolínové alkaloidy a jejich výskyt	13
3. 6.	Využití β-karbolínových alkaloidů	14
3. 7.	Základní struktury β-karbolínových alkaloidů	14
3. 8.	Biologické účinky β-karbolínů	16
3. 8. 1.	Inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	16
3. 8. 1. 1.	Acetylcholin a cholinesterasy	16
3. 8. 1. 2.	Alzheimerova choroba	17
3. 8. 1. 3.	Myasthenia gravis	22
3. 8. 2.	Další biologické účinky β-karbolínových alkaloidů	22
3. 8. 2. 1.	Inhibice monoaminooxidasy A a B	22
3. 8. 2. 2.	Inhibice dalších enzymů	25
3. 8. 2. 3.	Vazba β-karbolínových derivátů na serotoninové, dopaminové, benzodiazepinové, imidazolinové a glutamátové receptory	25
3. 8. 2. 4.	Antioxidační a antimutagenní aktivita	29
3. 8. 2. 5.	Další účinky	30
3. 8. 2. 6.	Toxicita	32
3. 9.	Biosyntéza β-karbolínů	32
3. 10.	Enzymy	34
3. 10. 1.	Měření enzymové aktivity	35
3. 10. 2.	Ovlivnění aktivity enzymů	36
3. 10. 2. 1.	Vliv teploty a pH	36

3. 10. 2. 2. Modulátory aktivity enzymů 37
3. 11. Metody stanovení inhibiční aktivity látek na ACHE a BUCHE 38
3. 11. 1. Test „Fast Blue B salt“ 39
3. 11. 2. Ellmanův test 40
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 42
4. 1. Chemikálie a přístroje 42
4. 1. 1. Chemikálie 42
4. 1. 2. Přístroje 42
4. 2. Rostlinný materiál 43
4. 2. 1. Lokality sběru 43
4. 2. 2. Zpracování rostlinného materiálu 43
4. 2. 3. Ztráta sušením, celkový popel a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové 44
4. 2. 3. 1. Ztráta sušením 44
4. 2. 3. 2. Celkový popel 44
4. 2. 3. 3. Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové 44
4. 3. HPLC 45
4. 3. 1. Příprava vzorků 45
4. 3. 2. HPLC analýza 45
4. 3. 3. Validace HPLC 49
4. 4. Stanovení inhibiční aktivity β-karbolínových alkaloidů a extraktů na ACHE a BUCHE (test „Fast Blue B salt“, Ellmanův test) 50
4. 4. 1. Příprava 50
4. 4. 1. 1. Příprava solí alkaloidů 50
4. 4. 1. 2. Příprava roztoků 50
4. 4. 2. Postupy 54
4. 4. 2. 1. Test „Fast Blue B salt“ na TLC 54
4. 4. 2. 2. Ellmanova metoda 54
4. 5. Detekce alkaloidů pomocí Dragendorffova činidla 55
4. 5. 1. Příprava činidla 55

4. 5. 2. Postup 56
4. 6. Statistické zpracování výsledků 56
5. VÝSLEDKY 58
6. DISKUZE 140
7. ZÁVĚR 149
8. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY 150
9. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA 154
10. POUŽITÁ LITERATURA 156
11. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ 162
12. SOUHRN 163

1. ÚVOD

Inhibitory acetylcholinesteras jsou látky využívané při léčbě myasthenia gravis a v poslední době hlavně v léčbě Alzheimerovy choroby.

Alzheimerova choroba je onemocnění, které je v lidské populaci stále častější. Jedná se neurodegenerativní proces, který postihuje převážně starší populaci nad 65 let. Přesto, že se již dlouhou dobu zkoumají příčiny a patologie tohoto onemocnění, do dnešního dne nebylo vše plně objasněno. Postupně v souvislosti s výsledky výzkumů je snaha najít co nejlepší léčivo, které by alespoň zmírnilo příznaky tohoto onemocnění a zvýšilo tak kvalitu života pacientů.

Jako terapeuticky nejslibnější látky se v současné době jeví inhibitory cholinesteras. Jednou z podmínek jejich terapeutického využití byl donedávna fakt, že by měli být co nejselektivnější na acetylcholinesterasu. Pokud totiž inhibují také butyrylcholinesterasu, což se nezřídka stává, mohou způsobit nežádoucí účinky v podobě křečí. Z posledních výzkumů ale vyplývá, že v pozdních fázích Alzheimerovy choroby dochází ke zvýšení hladiny butyrylcholinesterasy, pro tuto fázi by tedy mohla být zvýšená inhibiční aktivita na butyrylcholinesterasu naopak výhodou. [1, 2)]

Jako inhibitory acetylcholinesterasy působí některé přírodní látky, například alkaloidy. Jejich nevýhodou je však často špatná biologická dostupnost (látka se rychle rozkládá nebo špatně prostupuje přes hematoencefalickou membránu). Tento problém se vědci snaží vyřešit tvorbou semisyntetických derivátů s lepšími chemickými a fyzikálními vlastnostmi.

Dalším problémem je finanční náročnost izolace přírodních látek, většinou se totiž v rostlinách vyskytují jen ve velmi malém množství. Ideální by tedy bylo, aby se tyto látky daly snadno a levně uměle nasyntetizovat.

Stále se proto hledají nové zdroje inhibitorů cholinesteras. Jedním z nich by mohl být také vodní mech *Fontinalis antipyretica (Fontinalaceae).*

2. CÍL

Tato dizertační práce, která má název „Inhibiční aktivita extraktů z *Fontinalis antipyretica* a β-karbolínových alkaloidů na acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu“, se zabývá testováním inhibiční aktivity methanolového a acetonového extraktu z *F. antipyretica* a vybraných β-karbolínových alkaloidů na aktivitu ACHE a BUCHE.

Cílem této práce bylo:

- zjistit lokality výskytu *Fontinalis antipyretica (Fontinalaceae)*
- sběr vzorků, identifikace a stanovení alkaloidů obsažených ve *F. antipyretica*
- vypracovat HPLC metodu pro analýzu β-karbolínových alkaloidů
- stanovit inhibiční aktivitu extraktů z *Fontinalis antipyretica* a β-karbolínových alkaloidů na ACHE a BUCHE pomocí testu „Fast Blue B salt“ a Ellmanova testu
- zjistit vliv dimethylsulfoxidu na inhibiční aktivitu β-karbolínových alkaloidů

3. TEORETICKÁ ČÁST

Léčivé rostliny se již v minulosti používali jako zdroje přírodních léčiv. Některé z nich se stále aktivně využívají, jiné časem upadly v zapomnění. Jednou z těchto rostlin je také vodní mech pramenička (zdrojůvka) obecná - *Fontinalis antipyretica (Fontinalaceae).* V herbáři z roku 1899 je o jejím léčebném využití zmínka, dnes je to však z terapeutického hlediska rostlina neznámá. Sekundární metabolity tohoto mechu nebyly zatím blíže prozkoumány, nicméně v rodě *Fontinalis* byly objeveny látky dusíkaté povahy (alkaloidy s β-karbolínovou strukturou) a existuje předpoklad, že se podobné sloučeniny nachází také v prameničce obecné.

3. 1. Popis rostliny *Fontinalis antipyretica*

Vodní mech pramenička obecná (*Fontinalis antipyretica, Fontinalaceae)* roste v čistých i mírně znečištěných tekoucích vodách, vzácně ve vodách stojatých. Vyskytuje se jak v nížinách, tak v horských oblastech. Neroste na vápenitých půdách a je velmi odolný proti vyschnutí.

Lodyžky vyrůstají v sytě tmavozelených 100 až 400 mm dlouhých a bohatě větvených svazcích s četnými výhonky. Lístky na lodyžkách i postranních větvičkách jsou výrazně sestaveny ve třech řadách. Jsou dlouhé 3-5 mm, bez žebra, člunkovité, vejčitě podlouhlé a celokrajné. Štět je dlouhý jen 1-5 mm a vyrůstá z postranních krátkých větviček tak, že vejčité tobolky zdánlivě rostou mezi lístky. Výtrusy dozrávají v létě. Čepelné buňky jsou tečkované, obdélníkovité. Peritechiální lístky pohárkovitě obalují tobolku. Peristom je dvojitý, bradavičnatě papilnatý, tmavočervený. Jsou to rostliny dvoudomé. [3, 4)]

Rod *Fontinalis* je rozšířen po celé Evropě. V Čechách je jeho výskyt hlášen především v oblasti Šumavy (horní tok řeky Křemelné) [5)] a Krkonoš (Úpská jáma) [6)],

ale lze ho nalézt také v dalších lokalitách. [7)] Je známo 14 druhů tohoto rodu [8)], přičemž v České republice byly doposud objeveny zatím tři: *F. antipyretica*, *F. squamosa* (pramenička neboli zdrojůvka šupinatá) a F. hypnoides Hartm. (pramenička neboli zdrojůvka chabá). Třetí zmíněný druh byl objeven až nedávno v nevelkém množství na jihu Čech. Je velmi podobný druhu *F. antipyretica*, od něhož lze jen těžko rozeznat. Je řazen mezi nedostatečně známé druhy. [9)]

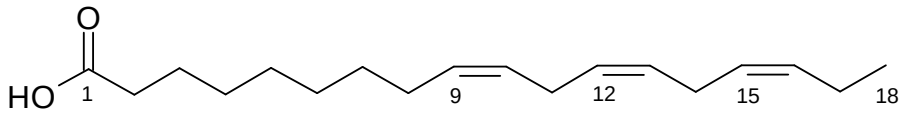
3. 2. Využití *Fontinalis antipyretica*

V herbáři z roku 1899 je uvedeno toto využití: "Plody nezralé potřebují se proti zimnici, odvar pak z nich dává se do koupele, a při prsních neduzích". [10)] V současné době není tato rostlina používána k terapeutickým účelům. Nicméně své využití nalezla. Vodní mech *F. antipyretica* se vyznačuje zajímavou vlastností – je schopen v sobě kumulovat těžké kovy a také například látky používané na léčbu bakteriálních infekcí. Proto se používá jako biomarker pro zjišťování čistoty vodních toků. [11, 12)]

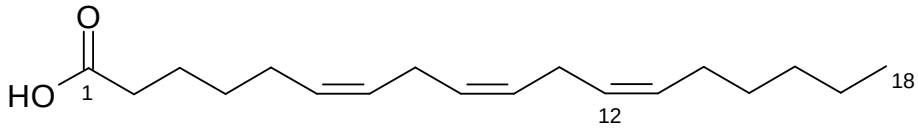
3. 3. Obsahové látky rodu *Fontinalis*

Fontinalis antipyretica nebyl doposud, co se týká obsahových látek, mnoho prozkoumán. Práce Kalachevy G. S. a kol. byla zaměřena na analýzu mastných kyselin a tuků. Nasycených MK je v mechu pouze malé množství, převládají polynenasycené MK s dvojnou vazbou - PUFA (30% všech MK) a s dvojnou a trojnou vazbou – acetylenové kyseliny (40% všech MK). Z nenasycených MK PUFA se v mechu nachází kyselina α a γ linolenová, arachidonová a ikosapentaenová. Acetylenových kyselin mech obsahuje celkem 7, nejvíce zastoupené jsou kyselina octadeca-9,12-dien-6-ynová, octadeca-9,12,15-trien-6-ynová a ikosa-11,14-dien-8-ynová. Poprvé byla v mechu identifikována ikosa-11,14,17-trien-8-ynová kyselina. Nenasycené mastné kyseliny tohoto mechu jsou důležitou součástí potravy vodních živočichů. [13)]

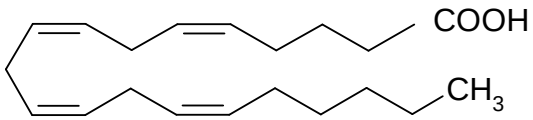
Obr. č. 1: Ukázka struktur mastných kyselin ve *Fontinalis antipyretica* [13)]



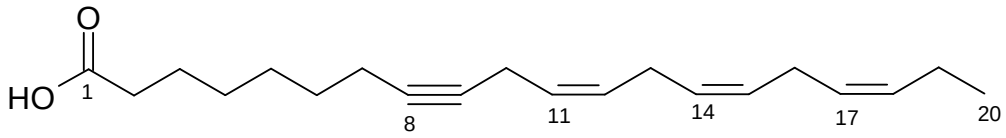
kyselina α-linolenová



kyselina γ-linolenová



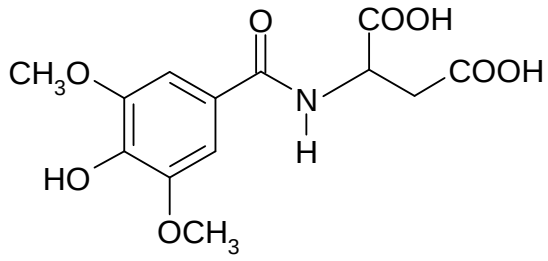
kyselina arachidonová



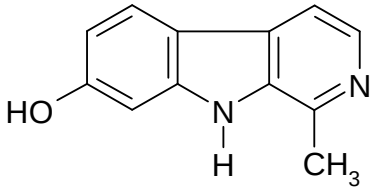
kyselina ikosa-11,14,17-trien-8-ynová

V příbuzném mechu *Fontinalis squamosa* byly objeveny 4 dusíkaté látky – fontinalin, harmol, kyselina harmolpropionová a její ester 4,5-dihydro-9-hydroxykanthinon. Struktura fontinalinu a esteru kyseliny harmolpropionové byla zjištěna a popsána v práci Salma R. F. a kol. poprvé. Harmol, kyselina harmolpropionová a její ester patří svou strukturou mezi β-karbolínové alkaloidy. Fontinalin neobsahuje typickou β-karbolínovou strukturu, jedná se pravděpodobně o prekurzor nebo rozkladný produkt látky či látek s β-karbolínovou strukturou. [14)]

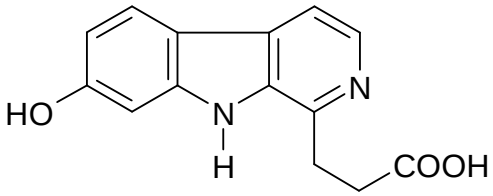
Obr. č. 2: Struktury dusíkatých látek ve *Fontinalis squamosa* [14)]



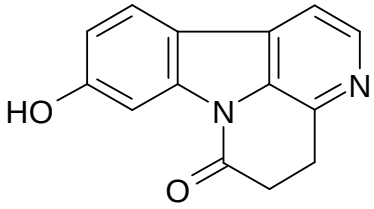
fontinalin



harmol



harmolpropionová kyselina



4,5-dihydro-9-hydroxykanthinon

3. 4. Biologické účinky *Fontinalis antipyretica*

Rovněž biologické účinky obsahových látek *Fontinalis antipyretica* nejsou téměř vůbec prozkoumány.

V práci Veljiće M. a kol. byly studovány antimikrobiální a antifungální účinky methanolového extraktu *F. antipyretica*. Antimikrobiální aktivita byla testována proti Gram (+) (*Bacillus subtilis, Micrococcus flavus* a *Staphylococcus epidermidis*) a Gram (-) (*Escherichia coli* a *Salmonella enteritidis*) baktériím. Antifungální aktivita extraktu byla testována na mikromycetech *Trichoderma viride, Penicillium funiculosum* a *ochrochloron, Aspergillus fumigatus, flavus* a *niger*. Aktivita extraktu byla pozitivní, nejvyšší aktivitu vykazoval extrakt proti G (-) baktériím. [15)]

3. 5. β-karbolínové alkaloidy a jejich výskyt

β-karbolínové alkaloidy jsou přírodní látky poměrně známé pro své různorodé účinky na lidský organismus, pro které jsou využívány již po dlouhou dobu v lidovém léčitelství, převážně v tropických oblastech. Mnoho z těchto účinků bylo vědecky prokázáno. Jsou stále předmětem různorodých výzkumů, v posledních letech se zkoumají hlavně jejich protirakovinné účinky.

β-karbolínové alkaloidy jsou rozšířenou skupinou látek, které lze nalézt v různých rostlinných čeledích, např. *Apocynaceae* (toješťovité), *Eleagnaceae* (hlošinovité), *Fabaceae* (bobovité), *Passifloraceae* (mučenkovité) a *Zygophyllaceae* (kacibovité). [16)] Tyto alkaloidy jsou také někdy nazývány harmalové, protože byly poprvé izolovány z rostliny *Peganum harmala (Zygophyllaceae).* [1)]

Kromě rostlin lze β-karbolínové alkaloidy nalézt v cigaretovém kouři, grilovaných potravinách a ve vínu. [17-20)] Některé z nich jsou dokonce běžnou součástí lidských a zvířecích tkání a tělních tekutin. Nalézají se v mozkové kůře a dalších mozkových tkáních, v játrech a nadledvinách. [21, 22)]

Tab. č. 1: Zástupci rostlin s obsahem β-karbolínových alkaloidů [23)]

Název rostliny	Obsažené alkaloidy
Banisteriopsis caapi Sp. *(Malpighiaceae)*	harmin, harmalin, tetrahydroharmin
Eleagnus angustigolia L. *(Eleagnaceae)*	tetrahydroharman, tetrahydroharmol
Passiflora incarnata L. *(Passifloraceae)*	harmin, harman, harmol
Peganum harmala L. *(Zygophyllaceae)*	harmin, harmalin, harmalol, harmidin
Symplocos racemosa Roxb.*(Symplocaceae)*	harman
Zygophyllum fabago L. *(Zygophyllaceae)*	harmin, harman, harmol

3. 6. Využití β-karbolínových alkaloidů

Mezi terapeuticky využívané rody rostlin obsahující β-karbolínové alkaloidy patří *Anadenanthera spp. (Fabaceae), Banisteriopsis spp., Terapteris spp. (Malpighiaceae)* a *Passiflora spp. (Passifloraceae)*. V Brazílii jsou používány pro jejich antispasmodické a sedativní účinky. [24)] V tradiční medicíně indiánů se rostliny rodu *Desmodium spp*. *(Fabaceae)* obsahující β-karbolínové alkaloidy používají k léčbě očních onemocnění a střevní malnutrice. Tento účinek je pravděpodobně způsoben schopností inhibovat acetylcholinesterasu. [1)]

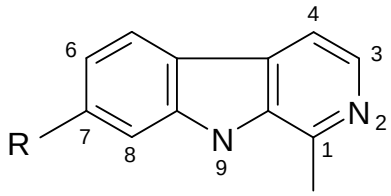
Kromě terapeutických účinků jsou některé drogy s obsahem β-karbolínů používané pro zlepšení účinků halucinogenních látek při náboženských obřadech v Jižní Americe a v Africe. Konkrétně se jedná o halucinogenní nápoj „ayahuasca“, který se připravuje z pralesních lián *Banisteriopsis caapi (Malpighiaceae)* a *Psychotria viridis (Rubiaceae)*. Alkaloidy v nápoji působí jako inhibitory monoaminooxidasy a zvyšují tak biodostupnost dimethyltryptaminu obsaženého v nápoji, který má prokázaný halucinogenní efekt podobný efektu LSD. Samotné β-karbolínové alkaloidy mají pravděpodobně také určité halucinogenní účinky. [25 - 27)]

3. 7. Základní struktury β-karbolínových alkaloidů

Základní strukturou β-karbolínových alkaloidů je látka s tricyklickou strukturou 9H-pyrido[3,4-b]indol. Podle nasycenosti pyridinového kruhu se rozdělují na deriváty β-karbolínů (harman, norharman, harmin a harmol), dihydro-β-karbolínů (harmalin a harmalol) a tetrahydrokarbolínů (tetrahydroharman). [27), 28)] Jednotlivé alkaloidy se mezi sebou liší substituentem (hydroxylová nebo methoxylová skupina) v poloze 7.

Obr. č. 3: Rozdělení β-karbolínových alkaloidů [27, 28)]

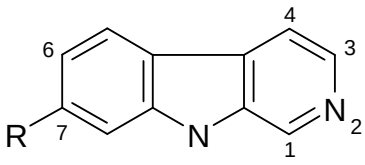
Aromatické β-karbolíny



R = H harman

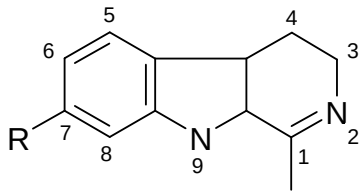
R = OCH_3 harmin

R = OH harmol



R = H norharman

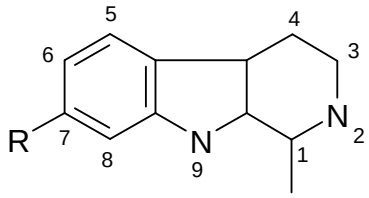
Dihydro-β-karbolíny



R = OCH_3 harmalin

R = OH harmalol

Tetrahydro-β-karbolíny



R = H tetrahydroharman

R = OCH_3 tetrahydroharmin

3. 8. Biologické účinky β-karbolínů

β-karbolínové alkaloidy mají široké spektrum účinků, především na muskulární, kardiovaskulární a centrální nervovou soustavu. V této práci byl zkoumán jejich inhibiční účinek na enzymy acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu. Mezi další účinky β-karbolínových alkaloidů patří inhibice i jiných enzymů, např. monoaminooxidasy A a B, vazba na různé druhy receptorů, např. benzodiazepinové, serotoninové a imidazolinové, s nimiž souvisí účinky konvulzivní a antikonvulzivní, anxiolytické a tremorogenní, dále mají schopnost interkalace do DNA, způsobují mutace v různých typech organismů a opomenuty nesmí zůstat ani jejich účinky antioxidační, neuroprotektivní a imunomodulační. [29)]

3. 8. 1. Inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

3. 8. 1. 1. Acetylcholin a cholinesterasy

Acetylcholin patří mezi důležité mozkové neurotransmitery. Je syntetizován nesynaptickými neurony z cholinu a acetyl-CoA prostřednictvím enzymu cholinacetyltransferasy po depolarizaci membrány. Stimuluje nesynaptické a postsynaptické muskarinové a nikotinové receptory, působí buď jako neurotransmiter, nebo jako neuromodulátor uplatňující excitační nebo inhibiční účinek na vzdálenější neurotransmiterové systémy. Reakce navozené acetylcholinem (ACH) odeznívají, když je acetylcholin v synaptické štěrbině katabolizován centrálně působícím enzymem acetylcholinesterasou (ACHE) nebo periferně účinkující butyrylcholinesterasou (BUCHE). ACH je neurotransmiter zajišťující pozornost (prefrontální kortex), operační paměť (hippokampus) a schopnost učení. [30)]

ACHE a BUCHE jsou serinové esterasy. Obě disponují velkou molekulární diverzitou, která je dána geneticky a dále během posttranskripční a posttranslační fáze při jejich tvorbě. Jsou známé 3 podjednotky ACHE - podjednotka R, H a T. Každá z nich je kódována specifickou mRNA. U BUCHE byl identifikován jen jeden

transkript, jehož proteinový produkt se nachází v několika globulárních formách (G1, G2 a G4) a může se vyskytovat v hydrofilní nebo amfifilní formě v závislosti na sdružování podjednotek do monomerů, dimerů nebo tetrametrů. [31)]

Nejlépe prozkoumanou funkcí ACHE a BUCHE je hydrolýza esterů cholinu, přičemž substrátová specifita BUCHE je mnohem širší než ACHE. Obě esterasy mohou hrát ovšem i jinou roli než je katalytická. Jako signální molekula se ACHE podílí na proliferaci a diferenciaci buněk, buněčné sekreci, cytoskeletální organizaci, buněčné kohezi, neuritogenezi (např. dopaminergní buňky v substantia nigra), hematopoéze, tumorogenezi, apoptóze, imunitní odpovědi a dalších. Její funkce začíná již v rané embryogenezi. BUCHE se podílí na patologickém procesu tvorby amyloidních plaků při pozdní fázi Alzheimerovy choroby. [31, 32), 33)]

Aktivity ACHE v červených krvinkách a BUCHE v séru můžou být použity jako potenciální ukazatelé jejich potlačené nebo zvýšené aktivity v centrálním a periferním nervovém systému. Pod vlivem organofosfátů, pesticidů, anestetik a různých drog jako je například kokain, u některých neurodegenerativních stavů a při nemocech jater jsou aktivity ACHE a BUCHE selektivně redukovány. [34)]

Mezi nejznámější onemocnění, která souvisí s poruchami v cholinergním systému, patří Alzheimerova choroba a myasthenia gravis.

3. 8. 1. 2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je postupný a progredující neurodegenerativní proces, který postihuje značné procento populace zejména ve věku nad 65 let. Ze všech druhů demencí tvoří AD přes 50%. V roce 2005 trpělo demencí 29,3 milionů lidí na celém světě, v roce 2009 se počet zvýšil na 34,4 milionů. V České republice v roce 2009 trpělo demencí 108 951 obyvatel. [35)] Je čtvrtou hlavní příčinou úmrtí v západních zemích. Nemoc je spojena s deficity a poruchami řady neurotransmiterových systémů, zejména systému cholinergního. Je charakterizována postupnou ztrátou paměti, neschopností vykonávat běžné denní aktivity, osobnostními změnami, postupující dezorientací, upadající schopností úsudku,

poruchami řeči, posupným rozpadem osobnosti a nakonec vede ke smrti. Charakteristickými znaky AD na buněčné úrovni je odumírání neuronů projevující se jako atrofie mozku hlavně v oblasti kortexu a hippokampu, akumulace senilních plaků (shluky odumřelých částí nervových buněk s masivním jádrem tvořeným bílkovinou beta-amyloidem) a neurálních klubek (vlákna stmelená proteinem tau) a celkovou dezorganizací neuronální sítě. Za rizikové faktory pro vznik AD se považuje vyšší věk, genetické faktory, demence v rodinné anamnéze, prodělaný úraz hlavy, ženské pohlaví, hypothyreóza, deprese, deficit vitamínu B12, nízká úroveň vzdělání a úzká duševní aktivita. [30, 36)]

Ke vzniku AD však mohou přispět i jiné faktory. V práci Husaina K. a Somaniho S. byl na krysách zkoumán vliv fyzického cvičení a podávání ethanolu v souvislosti s inhibicí ACHE a BUCHE. Z výsledků vyplynulo, že cvičení, chronická konzumace alkoholu a jejich kombinace mohou nepříznivě působit na funkci hypothalamu, což může mít za následek nejen poruchy tělesné teploty, ale hlavně poruchy kognitivních funkcí a chování. [37)]

Naopak protektivními faktory AD je vyšší psychická aktivita i ve vyšším věku, antioxidanty, lecitin, hormonální substituce u žen, nesteroidní antiflogistika a včasná léčba deprese. Zatím neexistuje kauzální léčba AD, pouze symptomatická.

Terapie AD by měla být komplexní, měla by léčit jak kognitivní deficity, tak i neuropsychiatrické symptomy a kromě farmakoterapie by měla zahrnovat i kognitivní trénink. Strategie farmakoterapie je tedy substituce neurotransmiterů, kterých při AD ubývá (ACH, serotoninu, dopaminu), podávání látek ovlivňující receptory, zhášeče volných radikálů, růstové faktory, antiflogistika, látky ovlivňující tvorbu amyloidu a u žen podávání estrogenu. K ovlivnění kognitivních funkcí se v terapii využívají prekurzory ACH (sojový lecitin), stimulátory muskarinových a nikotinových receptorů (milamelin, xanomelin), zvýšení syntézy enzymu acetylcholintransferasy (ergeloid), zvýšení obratu ACH (L-karnitin), léky bránící ukládání beta-amyloidu (inhibitory COX-2) a nejúčinnější inhibitory acetylcholinesterasy (ACHEI), které působí přímo na posílení funkce cholinergního

systému a zmírňují tak jeho deficit, který se považuje za hlavní patogenní mechanismus nemoci. [30)]

Dlouhodobé podávání ACHEI má za následek očekávaný pokles aktivity ACHE. V pozdních stádiích nemoci však dochází ke kompenzačnímu mechanismu organismu, který reaguje zvýšením hladiny BUCHE. [1, 2)] V pozdních stádiích AD by se tedy mohly v terapii dobře uplatnit také inhibitory BUCHE.

Inhibice ACHE a BUCHE v terapii AD

Inhibitory acetylcholinesterasy jsou látky, které musí dobře pronikat přes HEM a zároveň nesmějí inhibovat periferně se vyskytující BUCHE, neboť v důsledku toho by vznikaly nežádoucí účinky, jako jsou například křeče. Zároveň ACHEI nepřímo aktivují muskarinové a nikotinové receptory. V praxi se využívá hned několik skupin ACHEI. Jsou to akridinové přípravky (tacrin), piperidinové přípravky (donepezil), karbamáty (fysostigmin a rivastigmin), organofosfáty (metrifonát) a alkaloidy (galanthamin a huperzin). Mnohé používané ACHEI však mají své nevýhody. Patří mezi ně krátký nebo naopak příliš dlouhý poločas účinku, křeče kosterního svalstva a interakce s dalšími léky vzhledem k jejich metabolismu v játrech. [30)] Z tohoto důvodu je tedy objev nových ACHEI stále aktuálním tématem.

Přírodní inhibitory ACHE a BUCHE

Alkaloidy

K prvním používaným přírodním látkám ze skupiny ACHEI patřil eserin (fysostigmin). Získává se semen rostliny *Physostigma venenosum (Fabaceae)* a její anticholinergní účinky se již dříve využívali hlavně v očním lékařství a jako antidotum při otravě atropinem. [38)] V terapii AD se bohužel brzy projevily jeho hepatotoxické a gastrointestinální nežádoucí účinky, a proto se od jeho užívání postupně upustilo a začaly se hledat pro terapii AD nové látky. [30)]

Jednou ze skupin alkaloidů působících jako ACHEI jsou β-karbolínové alkaloidy. Práce Scotta Y. a kol. navazuje na práci Ghosala S. a kol., která byla zaměřena na zkoumání tetrahydro- a plně aromatických β-karbolínových derivátů, včetně jejich kvartérních solí, na inhibici ACHE. Některé z nich měly 1/6 aktivity fysostigminu, který je používaným referenčním ACHEI. Pokusy v následující práci byly prováděny s deriváty harmanu a norharmanu. Jako nejúčinnější inhibitory působily kvartérní soli, jejichž aktivita byla srovnatelná s referenčními drogami, kterými byly galanthamin a fysostigmin. Selektivněji na ACHE působily deriváty s CH_3 skupinou v poloze N 9, bez této substituce byla aktivita smíšená. Také terciární alkaloidy však vykázaly významnou aktivitu. Vyšší aktivitu derivátů s kvartérními a terciárními komponentami lze vysvětlit tím, že jsou strukturně podobné přírodnímu substrátu acetylcholinu. Bylo také zjištěno, že z terciárních alkaloidů jsou přímo v mozku *in vivo* tvořeny pomocí fenylethanolamin-N-methyltransferasy a 2N-methyltransferasy kvartérní struktury. Terciární alkaloidy navíc oproti kvartérním solím snadno přechází přes bariéru mezi mozkem a krví, mohly by se tedy stát ideálními prekurzory pro kvartérní alkaloidy. [1)]

Dalšími alkaloidy s inhibiční aktivitou na ACHE jsou deriváty rutaekarpinu, chinazolinokarbolínového alkaloidu izolovaného z *Evodia rutaecarpaas (Rutaceae).* Vykazují silnou inhibiční aktivitu a vysokou selektivitu na ACHE. [39)]

V rostlině *Senna spectabilis (Fabaceae)* se nachází dva alkaloidy piperidinového typu 3-O-acetylspektalin a spektalin, které se staly předlohou pro přípravu nových selektivních ACHEI mozkové ACHE (zkoumáno na krysách). [40)]

Galanthamin, získávaný z rodu *Galanthus* a *Narcissus* z čeledi *Amaryllidaceae*, patří také mezi známé inhibitory ACHE. V práci Pagliosa L. B. a kol. byl zkoumán vliv dalších isochinolinových alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* (montanin, hippeastrin and pretazettin) na inhibici ACHE. Nejvyšší aktivitu vykazoval montanin, který při koncentraci 1 mM inhiboval více než 50 % aktivity enzymu (1 mM roztok galanthaminu inhiboval přes 90% enzymu). [41)]

Huperzin A, alkaloid lykodinového typu isolovaný z *Huperzia serrata (Lycopodiaceae)*, je známý selektivní inhibitor ACHE. Vzhledem ke své dobré

toleranci patří mezi nadějné léky na AD. [36] V *Lycopodium annotium (Lycopodiaceae)* se nachází další lykopodiové alkaloidy, konkrétně lykopodanového typu. Ty však ukázaly v porovnání s fysostigminem jen slabý inhibiční vliv na ACHE i BUCHE. [42]

Alkaloid isaindigoton (látka se selektivní inhibiční aktivitou na BUCHE strukturně podobná tacrinu používaného k léčbě AD) izolovaný z kořenů čínské rostliny *Isatis indigotica* Franch *(Brassicaceae)* se stal předlohou pro syntézu dalších jeho derivátů, které prokázaly významnou inhibiční aktivitu na ACHE i BUCHE se selektivitou závislou na chemické substituci. [43]

Na základě oxoisoaporfinové struktury alkaloidů, které se nacházejí v další čínské rostlině *Menispermum dauricum* DC *(Menispermaceae)*, byly nasyntetizovány nové alkaloidy s výraznou inhibiční aktivitou s IC_{50} již v nanomolárním množství a výraznou selektivitou k ACHE. [44]

Také deriváty bereberinu, kvartérní báze izolovaná z kořenů *Coptis chinensis* Franch. *(Ranunculaceae)*, jsou ACHEI již v submikromolárním množství. [45]

Látky dalších struktur

Dalšími přírodními látkami s účinkem na inhibici ACHE i BUCHE jsou látky kumarinové struktury. [46]

Jako ACHE a BUCHE inhibitory byly zkoumány také deriváty flavonoidů. Jejich inhibiční aktivita byla vyšší než aktivita rivastigminu. Nejvyšší aktivitu prokázal isoflavonový derivát 6,7-dimethoxy-3-[4-(pyrolidin-1-yl-methyl)-fenyl]-4H-chromen-4-on, který byl účinnějším inhibitorem ACHE než donepezil. [47]

Dalším zdrojem ACHEI mohou být mikrobiální metabolity, konkrétně arisugacin A a B získané z *Penicillium sp.* FO-4259. Látky jsou meroterpenoidní struktury (meroterpeny jsou tvořeny terpenoidní složkou s navázaným polyketidickým řetězcem). Arisugacin A je vysoce selektivní inhibitor ACHE, BUCHE *in vitro* neinhibuje. [48]

3. 8. 1. 3. Myasthenia gravis

Myasthenia gravis je nervosvalové onemocnění, klinicky definované nadměrnou svalovou unavitelností a slabostí kosterního svalstva. Jedná se o autoimunitní onemocnění, u něhož byly prokázány protilátky proti nikotinovému acetylcholinovému receptoru na postsynaptické membráně nervosvalové ploténky. Prevalence tohoto onemocnění je 70-150 případů na milion obyvatel, vyskytuje se častěji u euroidní rasy v mírném klimatu. Základní roli v imunopatogenezi hraje thymus. Zde vznikají autoreaktivní T lymfocyty. Pomocí cytokinů pak dochází k aktivaci B lymfocytů, které produkují protilátky proti acetylcholinovému receptoru. Klinický obraz je typický manifestací slabosti a unavitelnosti postižených svalových skupin jako jsou svaly extraokulární, faciobulbární, šíjové, pletencové a respirační. Jednou z možností léčby je chirurgické odstranění thymu. Jako neinvazivní způsob léčby je symptomatická terapie, která využívá nejčastěji účinek ACHEI podávaných samostatně nebo v kombinaci s imunosupresivy, kterými jsou kortikosteroidy. Nevýhodou ACHEI je současná stimulace muskarinových receptorů, což má za následek parasympatickou hyperaktivitu. [49)]

Jak je uvedeno výše, β-karbolínové alkaloidy vykazují inhibiční aktivitu na ACHE. Některé z nich by se tedy mohly stát předlohou pro nové ACHEI používané pro léčbu myasthenia gravis.

3. 8. 2. Další biologické účinky β-karbolínových alkaloidů

3. 8. 2. 1. Inhibice monoaminooxidasy A a B

Monoaminooxidasa (MAO) je flavin-adenosid-dinukleotid (FAD) obsahující enzym, který je lokalizován na vnější membráně mitochondrií, v mozku, játrech, intestinální mukóze a jiných orgánech. Katalyzuje oxidativní deaminaci neuroaktivních a vazoaktivních biogenních aminů. Vyskytuje se ve dvou formách - jako MAO A a MAO B. Každý z enzymů je kódován jinými geny a charakterizován

odlišnými biochemickými a imunologickými vlastnostmi. Jejich tvorba probíhá v různých typech buněk a je závislá na vývoji a stárnutí. Z důvodu této rozdílnosti hraje velkou roli specifita inhibitoru. MAO A katalyzuje především serotonin a noradrenalin, MAO B fenylethylaminy a benzylaminy. Tyramin, dopamin a tryptamin jsou substráty obou enzymů. Abnormální aktivita MAO B je zodpovědná za neurologická onemocnění jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba, zatímco MAO A hraje důležitou roli například při depresi. [50)]

Parkinsonova choroba (PD) je způsobená nedostatečnou tvorbou dopaminu v substantia nigra (SN) v oblasti bazálních ganglií v mozku v důsledku zániku nervových buněk. Za fyziologických podmínek je dopamin tvořen v SN a je dále transportován do striata, odkud je uvolňován do synapsí. Pokud je dopaminu na synapsích nedostatek, dochází k poruše regulace hybnosti, k projevům Parkinsonovy choroby. Zároveň dochází také ke změnám jiných transmiterů, např. serotoninu, glutamátu a kyseliny γ-aminomáselné (GABA). Mezi hlavní příznaky této nemoci patří třes (tremor), svalová ztuhlost (rigidita), celková zpomalenost a chudost pohybů (bradykineze, akineze, hypokineze) a poruchy stoje a chůze, poruchy vegetativního nervstva a poruchy psychické. Prevalence tohoto onemocnění je v Evropě 84-187 nemocných na 100 000 obyvatel. Standartní léčba spočívá v podávání látek nahrazující dopamin (levodopa, agonisté dopaminu) a látek působících na metabolismus levodopy a dopaminu a na jiné systémy nervových přenašečů (inhibitory MAO B a katechol-O-methyltransferasy, amantadin a anticholinergika). Mnohé z uvedených látek však mají své nežádoucí účinky. Kupříkladu levodopa má sice rychlý nástup účinku v léčbě, ale zároveň se zde objevují jako nežádoucí účinky nepředvídatelné a mimovolní pohyby. Z tohoto důvodu se stále hledají nové terapeutické látky. [51, 52)]

V práci Kima H. a kol. byly provedeny pokusy účinku β-karbolínových a dihydro-β-karbolínových alkaloidů na inhibici MAO A a B. Jako zdroj MAO A byla použita lidská játra, zdrojem MAO B byla hovězí játra. Výsledky ukázaly, že všechny použité alkaloidy jsou reverzibilní kompetitivní inhibitory s vyšší afinitou k MAO A. Vyšší účinky měly látky s 1-methyl-7-methoxy substitucí, přičemž

nejvyšší inhibiční aktivitu vykazoval harmalin a harmin společně s jeho deriváty s methylovou skupinou v poloze 2 a 9. Inhibice spočívá v tom, že alkaloidy reagují s kovalentně navázaným flavinem, čímž se změní konformace proteinové části enzymu, který tímto ztratí dočasně svou aktivitu. [53)]

V práci Schwarze M. J. a kol. byl studován účinek právě těchto dvou nejúčinnějších alkaloidů (harmalinu a harminu) na léčbu PD. Při pokusu na krysích játrech byly použity harmin, harmalin a extrakt z pralesní liány *Banisteriopsis caapi (Malpighiaceae)*, která tyto dvě látky obsahuje. Látky působily v závislosti na koncentraci inhibici MAO A, na MAO B působily jen minimálně. Při vyšší koncentraci (2,5 mg/ml) způsobily dokonce významné zvýšení dopaminu pomocí zvýšeného uvolňování ve striatu krys. Nejúčinnější byl extrakt a také harmalin vykazoval dobrou biologickou aktivitu. Harmin byl v použité koncentraci téměř neúčinný. Vzhledem k těmto výsledkům je pravděpodobné, že se na účinku extraktu podílejí ještě jiné obsahové látky rostliny *B. caapi* nebo že zde dochází k synergismu. [51)]

β-karbolíny se nacházejí také v kávě. Bylo zjištěno, že u pravidelných konzumentů kávy se snížilo riziko výskytu PD až o 30%. V inhibici MAO A byl nejúčinnější norharman a harman, na MAO B norharman. Tyto dvě látky byly objeveny také v cigaretovém kouři, kde se rovněž účastní inhibice MAO. [50)]

V mozku MAO aktivuje přeměnu proneurotoxinu N-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu (MPTP) na N-methyl-4-fenylpyridinium (MPP^+), který je zodpovědný za patogenezi PD. [53)] Bylo zjištěno, že pacienti trpící idiopatickou PD, u které není známá příčina vzniku, mají v plazmě a mozkomíšním moku zvýšenou hladinu β-karbolínů, hlavně N2-methylovaných derivátů, a že hrají tedy pravděpodobně roli v patogenezi PD. Tyto deriváty jsou strukturně podobné MPP^+ iontu – mají neurotoxický účinek a působí jako mitochondriální inhibitory. Způsobují však také inhibici MAO A. Jejich účinek na organismus se projevuje tremorem. [50, 54)] Ochrana proti PD pomocí MAO inhibitorů je pravděpodobně způsobena nejen snížením aktivity toxinů, ale také redukcí produkce peroxidových, amoniových a aldehydových radikálů. [50)]

3. 8. 2. 2. Inhibice dalších enzymů

Norharman kromě MAO a ACHE inhibuje ještě další dva enzymy – indolamin-2,3-dioxygenasu (IDO) a nitric oxid synthesu (NOS). IDO je imunomodulační enzym produkovaný makrofágy a dalšími buňkami imunitního systému. Katalyzuje přeměnu tryptofanu na neurotoxické metabolity kynureninu. Makrofágy však také uvolňují značné množství oxidu dusnatého (NO), který může hrát klíčovou roli v patogenezi neurologických onemocnění. Norharman nejen že způsobuje snížení tvorby kynureninových derivátů, ale dokonce snižuje také tvorbu NO pomocí inhibice enzymu NO syntasy (NOS). Způsobuje také inhibici tohoto enzymu v koronárních cévách. [55)]

Další β-karbolínový derivát 5-bromo-6-methoxy-β-karbolín prokázal inhibiční aktivitu na enzym IκB kinasu. Tento enzym potlačuje transkripci NF-κB (nukleární faktor kapa B), který se podílí na expresi prozánětlivých cytosinů, adhezi molekul, růstových faktorů a proteinů působících proti apoptóze buněk. Tato látka má tedy potenciál k léčbě zánětlivých onemocnění a rakoviny. [56)]

3. 8. 2. 3. Vazba β-karbolínových derivátů na serotoninové, dopaminové, benzodiazepinové, imidazolinové a glutamátové receptory

Vazba na serotoninové a dopaminové receptory

Serotoninové receptory se dělí do 4 základních skupin – 5-$HT_{1-4.}$ 5-TH_1 a 5-TH_4 rcp jsou spojeny s adenylátcyklasou, 5-TH_2 rcp s proteinkinasou C a 5-TH_3 působí na kationové kanály. 5-TH_1 rcp hrají roli v kontrakci artérií a cév, 5-TH_2 rcp jsou zodpovědné za konstrikci hladké vaskulární i nevaskulární svaloviny a neuroexcitaci, 5-TH_3 rcp souvisí s vomitem a také se podílejí se na depolarizaci CNS a periferního nervového systému, 5-TH_4 rcp zvyšují EEG energii v mozku a periferně zvyšují motilitu zažívacího traktu. Všechny receptory souvisí s emocionálními změnami v organismu. Látky vážící se na serotoninové receptory

hrají roli v léčbě úzkosti, deprese, schizofrenie, migrény, zvracení, hypertenze, motility GIT, bolesti a při problémech funkce srdce. [57)]

Dopaminové receptory se dělí do dvou hlavních skupin D_1 a D_2. Na D_1 receptory se váží benzazepiny a aktivují adenylátcyklasu, D_2 receptory hrají roli v působení většiny neuroleptik. Dopaminové receptory se podílejí na některých druzích onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, schizofrenie a Huntingtonova choroba, dále hrají roli v závislosti na kokainu a alkoholu, při stresu a hypertenzi. [58, 59)]

Na serotoninové receptory v mozku se váže většina známých halucinogenů. Některé halucinogeny, např. LSD, se kromě serotoninových receptorů váží rovněž na dopaminové receptory, kde působí jako agonisté. Vzhledem k tomu, že jsou β-karbolínové alkaloidy strukturní analogy DMT, existuje zde možnost, že by mohly také vykazovat stejné účinky jako tato látka - DMT patří mezi indolalkylaminy s halucinogenní aktivitou. Kontrolované studie halucinogenních účinků β-karbolínových derivátů sice chybí, ale přesto se dá na ně usuzovat vzhledem k reakcím, které vyvolávají rostliny obsahující tyto látky. V pokusu, který provedl Glennon R. A. a kol., bylo zkoušeno, jak se jednotlivé β-karbolíny váží na serotoninové (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} a 5-HT_{1A}) a dopaminové receptory. Z výsledků vyplynulo, že se β-karbolínové alkaloidy váží s mírnou afinitou na receptory 5-HT_{2A}, přičemž jejich afinita je závislá na substituentech a nasycenosti kruhů. Z plně aromatických alkaloidů vykazoval nejvyšší afinitu harman a harmin, u částečně nasycených pak harmalan a 5-methoxyharmalan a u tetrahydroderivátů 8 a 5-methoxytetrahydroharman. Afinita ke zbývajícím serotoninovým a dopaminovým receptorům byla zanedbatelná. I když s dopaminovými receptory nereagují, i přesto však dopaminergní systém ovlivňují, a to inhibicí MAO (touto tématikou se blíže zabývá kapitola 3. 8. 2. 1.). Z pokusů vyplynulo, že ačkoliv jsou β-karbolíny strukturními analogy DMT, váží se pravděpodobně na 5-HT_2 receptory s jinou orientací struktury než DMT. Nelze je proto s jistotou zařadit mezi 5- HT_{2A} agonisty a tím pádem ani mezi klasické halucinogeny. Je zde také možnost, že je jejich halucinogenní efekt způsoben vazbou na jinou skupinu receptorů. [27)]

Díky stimulaci 5-HT receptorů způsobují harmalové alkaloidy hypotermii. [60)]

Vazba na benzodiazepinové receptory

Benzodiazepinové receptory jsou součástí tzv. GABAergního komplexu. GABAergní komplex je složený pentamer obsahující receptor benzodiazepinový, GABAergní, steroidní, barbiturátový a pikrotoxinový. Jeho středem prochází chloridový kanál. Nachází se převážně v hippokampu, bulbu olfactoriu, substancia nigra, mozečku, striatu, mozkovém kmeni a míše. Navázáním benzodiazepinů na tento receptor dochází k otevření Cl^- kanálu, následné hyperpolarizaci a tím k útlumu. Látky vážící se na benzodiazepinový receptor působí jako anxiolytika nebo naopak působí anxiogenně, dále způsobují amnesii, mají účinky antikonvulzivní nebo konvulzivní, sedativní a hypnotické, centrálně myorelaxační a mírně hypotonické. [61)]

Dobrou afinitu k benzodiazepinovému receptoru vykazují β-karbolínové deriváty methyl-β-karbolín-3-karboxylát (β-CCM) [27)] a methyl-6,6-dimethoxy-4-ethyl-β-karbolín-3-karboxylát (DMCM). Vazba těchto alkaloidů na tento receptor vyvolává konvulzi. [62)]

Také norharman je známý svou reaktivitou s bezodiazepinovými receptory v hippokampu, neokortexu, hypothalamu, thalamu, nucleu accumbens a amygdalae. Positivní efekt norharmanu na retrográdní amnésii způsobenou diazepamem a brotizolanem je způsoben pravděpodobně právě vazbou na tyto receptory. Antiretrográdní efekt norharmanu může být podpořen také vazbou norharmanu na receptory 5-HT a dopaminové. [63)]

Vazba na imidazolinové receptory

Jsou známy dva typy imidazolinových receptorů - I_1, klonidinové receptory, a I_2, receptory idazoxanové. Imidazolinové receptory jsou skupinou receptorů, na které se váží látky imidazolinové nebo guanidinové struktury. Tato vazba způsobuje

snížení aktivity sympatiku, krevního tlaku a nitroočního tlaku. Antidepresiva vážící se na imidazolinové receptory způsobují jeho down-regulaci. Bylo zjištěno, že I_1 receptory v mozku jsou zvýšené u pacientů trpících depresí a I_2 receptory jsou zvýšené při Alzheimerově chorobě. [64, 65)]

Pokusy Aricioglu-Kartala F. a kol. byly provedeny na krysách závislých na morfinu. Výsledky ukázaly, že harman a harmin měly na abstinenční syndrom pozitivní vliv, přičemž harmin se ukázal mnohem efektivnější než harman. Kromě vysvětlení působení těchto látek přes imidazolinové receptory zde byla popsána také možnost, že je tento účinek způsoben pomocí zprostředkování inhibice syntézy oxidu dusnatého, který by mohl být podle některých hypotéz zodpovědný za opioidní fyzickou závislost. [66)]

Vazba β-karbolínových alkaloidů na imidazolinové receptory, I_1 a I_2, včetně pozitivního efektu byla potvrzena rovněž v práci Husbanda S. M. a kol.. [67)]

Také pokusy s norharmanem ukázaly pozitivní účinky tohoto alkaloidu na odstranění abstinenčních příznaků u krys závislých na morfinu léčených naloxonem. [68)]

Vazba β-karbolínových alkaloidů na imidazolinové receptory může mít za následek také zvýšení sekrece insulinu z Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Tato skupina látek se tedy jeví jako potenciální inzulínové sekretogogum. [69)]

Vazba na glutamátové receptory

Glutamát patří mezi hlavní excitační mediátory v mozku. Glutamátové receptory se dělí na ionotropní (AMPA, NMDA a KA) a metabotropní (skupina I, II a III). Vazba látek na AMPA a NMDA receptory má za následek konvulzivní a antikonvulzivní účinky, látky vážící se na KA receptory mohou způsobit poruchy v limbickém systému. Metabotropní receptory jsou zodpovědné za změny vodivosti K^+ kanálů a napěťově řízených Ca^{2+} kanálů. [70)]

β-karbolíny se podle studie Moury D. J. a kol. váží na NMDA receptory kalciových kanálů, které se pravděpodobně podílejí také na formulaci paměti. Plně

aromatické alkaloidy, harmin a harmol, zvyšovaly v pokusech především krátkodobou paměť (STM), zatímco dihydroderiváty zvýšily paměť krátkodobou i dlouhodobou (LTM). Proces formování paměti je však složitější a zahrnuje větší množství receptorů. Je tedy možné, že působení těchto látek probíhá také přes jiné receptory, např. serotoninové. [71)] Tyto látky by se tedy mohly použít při léčbě poruch paměti.

3. 8. 2. 4. Antioxidační a antimutagenní aktivita

Některé z β-karbolínových alkaloidů (harman, harmalin a harmalol) vykazují antioxidační aktivitu tím, že inhibují peroxidaci lipidů v játrech [72)] a zmírňují oxidativní poškození kyseliny hyaluronové, kolagenu v chrupavce nebo imunoglobulinu G. Také bylo zjištěno, že β-karbolíny chrání neurony proti cytotoxickému efektu dopaminu a glutamátu. Jiné studie ukázaly, že tyto alkaloidy mají ochranný efekt proti oxidativnímu neuronálnímu poškození díky vychytávání reaktivních forem kyslíku. Ty jsou zodpovědné za oxidativní stres a mohou aktivovat fytopatologické procesy a chronické nemoci jako je např. diabetes, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a hlavně rakovina. V práci Moury D. J. a kol. byla testována aktivita β-karbolínových alkaloidů v souvislosti s jejich antioxidačními a antimutagenními účinky. Pokusy byly prováděny na kvasince *S. cerevisiae* a na savčích buňkách. Z výsledků vyplynulo, že tyto alkaloidy mají výrazný antioxidační efekt a jejich schopnost vychytávat volné OH^- radikály přispívá také k jejich antimutagennímu a antigenotoxickému účinku. Tyto účinky jsou závislé na koncentraci a chemické struktuře – dehydrogenace pyridinového kruhu a záměna hydroxylové skupiny za methoxylovou vede ke snížení antioxidačního účinku. Nejvyšší aktivitu vykazoval alkaloid harmalol. [29)]

Antitumorózní aktivita byla zkoumána také v práci Caa R. a kol.. Byly zde uměle nasyntetizovány další deriváty harminu, který se zdá být díky své vysoké cytotoxické aktivitě proti tumorovým lidským buňkám nejperspektivnější. Jako nejúčinnější látky se ukázaly deriváty s benzylovým substituentem v poloze 2,

přičemž akutní toxicita alkaloidů se dramaticky snížila pomocí vhodných substituentů v poloze 3 a 9. β-karbolínová struktura by se tedy mohla v budoucnu stát velmi důležitým základem pro syntézu nových léků na rakovinu, které by měly významnou antitumorózní aktivitu a zároveň nízkou toxicitu. [73)]

Práce Ishidy J. a kol. také potvrzuje, že harmin a jeho deriváty se zdají být proti rakovině nejúčinnější. [74)]

Harman a norharman poskytují komutagenní efekt s různými komponentami v *Salmonella typhimurium* TA98 [75)] a v kulturách savčích buněk. [76)] Obě tyto látky mají schopnost indukovat SCE (sister chromatid exchange) v lidských lymfocytech. Tyto účinky spočívají ve schopnosti interkalace β-karbolínů do DNA. [77)] Navíc jsou schopné indukovat apoptózu buněk SH-SY5Y lidského neuroblastomu. [24)]

Další antitumorózní účinek těchto látek, konkrétně harminu, spočívá v inhibici enzymů cyclin-dependentních kinas. Tyto enzymy hrají hlavní roli ve fungování buněčného cyklu. Účastní se například také diferenciace buněk a apoptózy. Inhibice tohoto enzymu spočívá v kompetici harminu s molekulou Mg-ATP. V pokusu Songa Y. a kol. způsobil inhibici DNA replikace tumorových buněk a tím jejich proliferaci, aniž by ovlivňoval fibroblasty [78)].

3. 8. 2. 5. Další účinky

Vazorelaxační efekt

V práci Shi Ch. Ch. a kol. byl zkoumán vliv harmanu na vazorelaxaci. Bylo zjištěno, že tato látka působí na endoteliální buňky produkující vazorelaxační látku oxid dusnatý (NO) a dále inhibuje napětí hladkého svalstva vazbou na napěťově řízené vápníkové kanály. Harman je tedy potenciální hypotenzívum. [79)]

V práci Berrouguiho H. a kol. byla zkoušena aktivita harminu a harmalinu. Výsledky ukázaly, že vazodilatační účinek těchto látek je způsoben inhibicí PDE (fosfodiesterasy) a indukcí relaxace přes prostacyklin. Oba alkaloidy působí také jako kompetitivní antagonisté α_1-adrenergních receptorů. Obě látky navíc

vychytávají volné radikály, což může také přispívat k jejich vazorelaxační aktivitě. [80)]

Antibakteriální a antimykotická aktivita

Norharman disponuje antimikrobiální aktivitou proti různým druhům cyanobakterií, G (+) a G (-) bakteriím a proti kvasince *Candida albicans.* [28)]

Vazba na cytochrom

V pokusech bylo dokázáno, že se norharman váže s vysokou afinitou na steroidní cytochromy P450 (CYP) typu CYP 11 a CYP 17. Na P450 způsobuje inhibici metabolismu látek benzo[a]pyrenového typu a mutagenicity. Na podtypu CYP 17 dochází ke kompetitivní inhibici norharmanu s progesteronem a je tedy potencionálním endogenním modulátorem biosyntézy steroidních hormonů. [81)]

Regulace exprese receptoru PPARγ

Harmin, regulátor exprese receptoru PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gama), centrálního regulátoru pro diferenciaci a expresi adipocytů, který se podílí na lipidovém a glukózovém metabolismu, je potenciální látkou při léčbě inzulínové rezistence u obézních pacientů trpících diabetes typu 2. Ovlivněním exprese PPARγ dochází k antidiabetickému efektu. Oproti thiazolidinových látkám, které se v praxi používají, nezpůsobuje nárůst hmotnosti pacientů a ukládání lipidů v játrech. [82)]

Vliv na BDNF

Harmin způsobuje zvýšení BDNF (brain-derived-neurotrophic factor) v hippokampu. BDNF se podílí na přežívání, podpoře a růstu mozkových a

periferních neuronů. Bylo zjištěno, že pacienti trpící depresí mají tento faktor snížený. [83)] Harmin by tedy mohl tímto mechanismem přispívat ke zlepšení depresí.

3. 8. 2. 6. Toxicita

Přes všechny pozitivní účinky na léčbu různých onemocnění jsou některé karbolínové alkaloidy toxické substance. Kupříkladu halogenovaný derivát 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-karbolín (TaClo) je progresivní neurotoxin. [84)] Harman a norharman se ukázaly jako neurotoxické β-karbolíny s mutagenními a komutagenními účinky, podobnost harmanu s neurotoxinem N-methyl-4-fenylpyridinium může dokonce přispět k vyvolání idiopatické Parkinsonovy choroby. [54)]

Další nežádoucí účinky karbolínových alkaloidů u prokaryotických a eukaryotických buněk jsou způsobeny interkalací alkaloidů do DNA, které vedou k alteracím v replikaci DNA a enzymatických aktivit v procesech oprav DNA. [24)] Konkrétně harmin a jeho deriváty ukázaly velkou schopnost interkalace do DNA a navíc inhibici topoizomerasy I. [85)] Právě interkalace látek do DNA může být na jednu stranu významná vlastnost při boji proti rakovinně, ale zároveň zde hrozí nebezpečí poškození zdravých buněk.

3. 9. Biosyntéza β-karbolínů

V rostlinách se β-karbolínové alkaloidy syntetizují Mannichovou/Pictet-Spenglerovou reakcí. Jedná se o kondenzaci indolylethylaminu (tryptaminu) s aldehydem nebo s α-ketokyselinou. Při reakci s aldehydem vznikne Shiffova báze (iminový kation), poté dojde ke ztrátě protonu na C2 a kruh se zacyklí. Následnou oxidací vznikají dihydro-β-karbolíny a dále plně nasycené β-karbolíny.

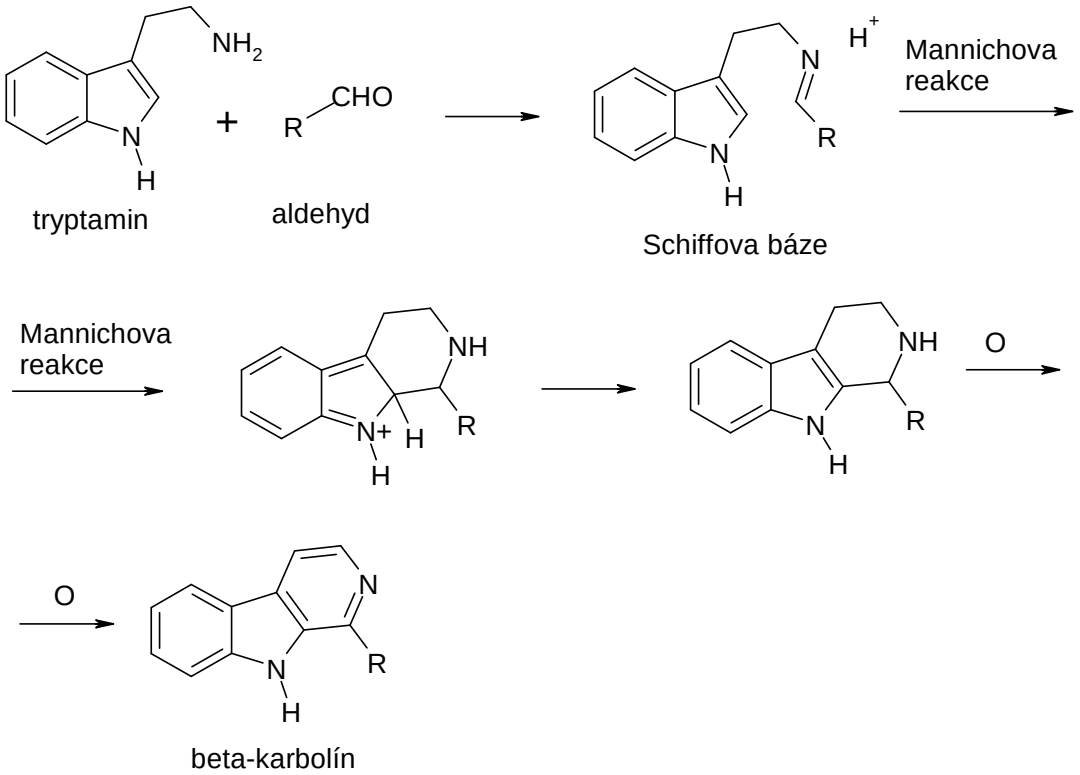
Při reakci s α-ketokyselinou (např. s kyselinou pyrohroznovou) dojde opět ke kondenzaci. Dalším krokem je oxidativní dekarboxylace, která dá vzniknout dihydro-β-karbolínům. Ty se mohou dále redukovat na tetrahydro-β-karbolíny, nebo se

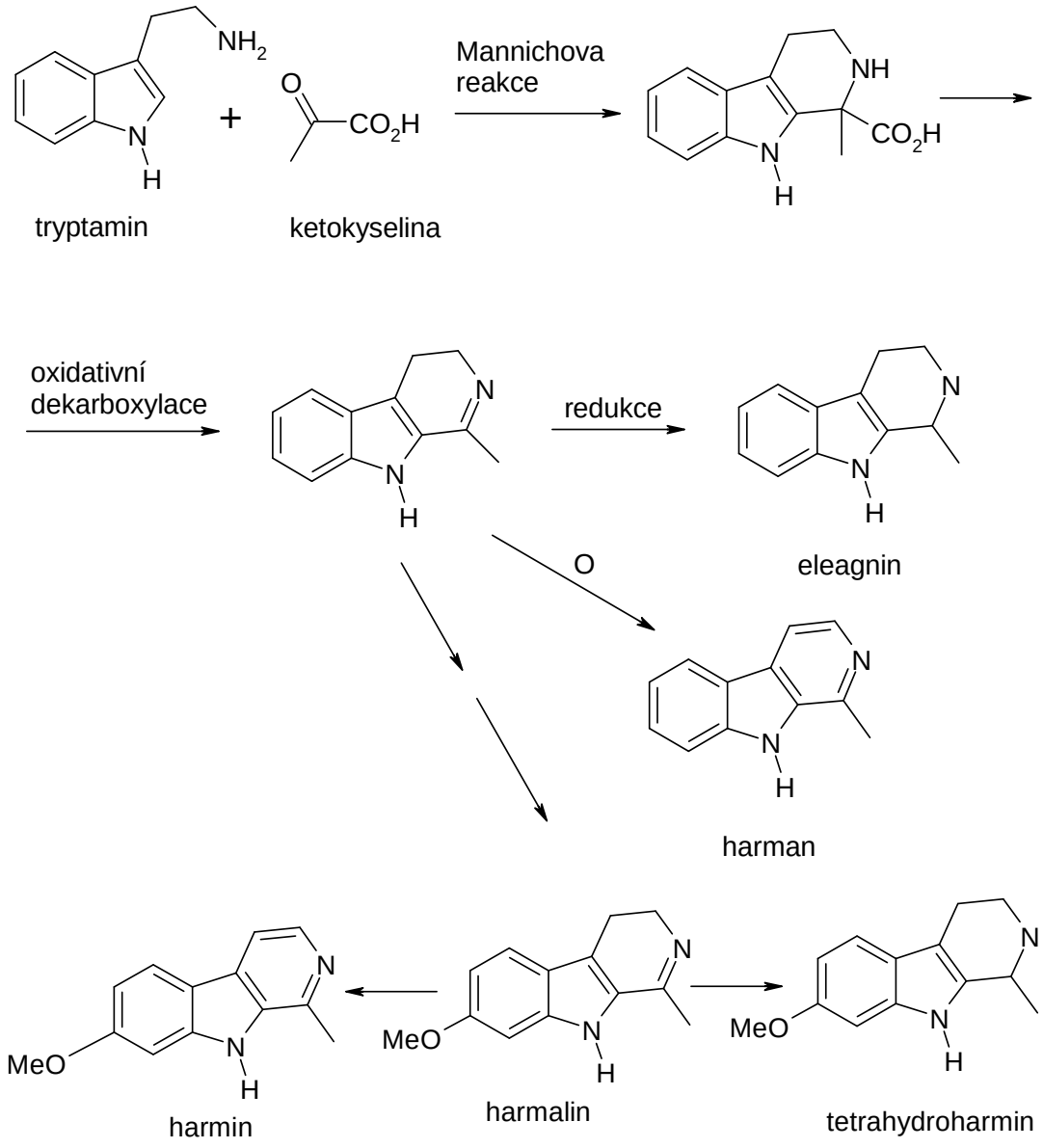
oxidují na plně aromatické β-karbolínové struktury. Takto například vzniká methoxysubstitucí (pomocí hydroxylace a následné methylace) dihydroderivátů harmalin, který se může dále oxidovat na harmin, nebo redukovat na tetrahydroharmin. [86)]

Analogické reakce probíhají také v potravinách (např. v sojové omáčce nebo uzeném mase), kde jsou jako výchozí látky L-tryptofan a formaldehyd nebo acetaldehyd a jako nejčastější produkt vzniká kyselina tetrahydro-β-karbolín-3-karboxylová. Tyto reakce jsou závislé na teplotě a pH. [87)]

V lidském těle jsou výchozími látkami pro syntézu β-karbolínů biogenní aminy tryptofan, tryptamin a serotonin, které reagují s aldehydy nebo α-ketokyselinami. [1)]

Obr. č. 4: Syntéza β-karbolínů [86)]





3. 10. Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory ovlivňující rychlost, kterou probíhají biochemické reakce v organismech. Snižují hodnotu aktivační energie E_a, což je energie potřebná k přeměně substrátu na produkt. Pomocí enzymů se reakce rozdělí do několika dílčích reakcí, z nichž každá má zřetelně nižší hodnotu E_a a tím enzymy přispívají k urychlení reakce.

Většina enzymů jsou složené bílkoviny. Skládají se z bílkovinné části apoenzymu a nebílkovinné části kofaktoru. Kofaktor může být na bílkovinnou část pevně navázán (prostetická skupina) anebo jej lze volně oddělit (kofaktor). Kofaktorem jsou většinou nukleotidy nebo modifikované vitamíny. Samotný apoenzym ani koenzym katalytickou aktivitu nemají. Molekulová hmotnost enzymů je různá, pohybuje se od 10 000 až k obrovským hodnotám.

Na molekule enzymu jsou aktivní a allosterická místa. Na aktivní místa se váží substráty a přeměňují se zde v produkty, na allosterická místa se váží efektory, které dále ovlivňují průběh reakce.

Aktivní místo je charakterizováno trojrozměrným seskupením zbytků aminokyselin. Nachází se zde skupiny vazebné, které zajišťují vazbu se substrátem, a katalytické, které se podílí na vlastní katalytické reakci. Substrát se na enzym váže slabými nevazebnými interakcemi, jako jsou například vodíkové můstky, hydrofilní interakce a van der Waalsovy síly. Aktivní místo je obvykle umístěno v prohlubni nebo žlábku.

Význačným rysem enzymů je specifita jejich působení. Enzym katalyzuje přeměnu jen určitého substrátu (specifita substrátová) a reakce katalyzovaná enzymem probíhá jen určitým způsobem (specifita účinku). Další významnou vlastností enzymů je jejich vysoká účinnost. [88, 89)]

3. 10. 1. Měření enzymové aktivity

Množství enzymu lze vyjadřovat v gramech nebo molech jako u jiných látek, ale pouze v případě, že se pracuje s čistým enzymem, jehož molekulová hmotnost je známa. Protože často není tato podmínka splněna, je obvyklejší vyjadřovat množství enzymu jeho aktivitou. Abychom mohli stanovit katalytickou aktivitu enzymu, je třeba znát chemickou podstatu reakce, kterou enzym katalyzuje a mít k dispozici jednoduchou metodu pro sledování úbytku substrátu nebo přírůstku produktu s časem. Je třeba znát hodnotu Michaelisovy konstanty K_m pro daný substrát, aby se měření provádělo při saturační koncentraci substrátu, kdy reakce probíhá kinetikou

0. řádu, tzn., že rychlost reakce je úměrná koncentraci enzymu (Michaelisova konstanta je koncentrace substrátu, při níž enzymová reakce probíhá polovinou maximální rychlosti). Také je třeba znát pH optimum enzymu a vliv teploty na něj.

Standartní jednotka enzymové aktivity U je takové množství enzymu, které přemění 1 µmol substrátu za 1 minutu za standartních podmínek (pH optimum enzymu a 25 °C). V SI systému jednotek byla zavedena jednotka enzymové aktivity katal (kat), což je množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu, tzn. 1 kat = 6E07 U. Koncentrace enzymu se vyjadřuje v aktivitě vztažené na jednotku objemu (U/ml). Mírou čistoty enzymového preparátu je specifická aktivita, což je aktivita vztažená na množství proteinu (U/mg). Mírou katalytické schopnosti enzymu je jeho molekulární aktivita, tj. počet molekul substrátu přeměněných jednou molekulou enzymu za 1 minutu. [88, 89)]

3. 10. 2. Ovlivnění aktivity enzymu

Aktivita enzymu je ovlivňována několika faktory. Je to především teplota, pH, koncentrace enzymu a substrátu a přítomnost aktivátorů nebo inhibitorů enzymu.

3. 10. 2. 1. Vliv teploty a pH

Rychlost většiny chemických reakcí závisí na teplotě. Jejich rychlost se přibližně dvakrát zvýší při zvýšení teploty o 10 °C. Pokud však teplota překročí kritickou hodnotu, převáží tepelná denaturace proteinové molekuly katalyzátoru a rychlost enzymové reakce začne klesat. Teplotní optimum enzymu je tedy výsledkem těchto dvou protichůdných procesů.

Aktivita enzymů závisí na koncentraci H^+ v prostředí. Většinou má tato závislost tvar křivky s maximem, které odpovídá pH optimu. Podstatou vlivu H^+ je acidobazický charakter molekuly enzymu, zvláště v aktivním centru. Hodnota pH optima se nemusí shodovat s pH, při kterém musí enzym fungovat v organismu. [88, 89)]

3. 10. 2. 2. Modulátory aktivity enzymů

Modulátory jsou látky, které ovlivňují rychlost enzymové reakce tím, že interagují s katalyzátorem.

Látky, které zvyšují aktivitu enzym, se nazývají aktivátory. Jedná se především o organické sloučeniny a anorganické ionty.

Inhibitory jsou naopak látky, které aktivitu enzymu snižují. Fyzikálních faktory a agresivní látky jako jsou silné kyseliny a hydroxidy, organická rozpouštědla, detergenty a soli těžkých kovů sice aktivitu enzymu také inhibují, nicméně se za vlastní inhibitory nepovažují.

Specifické inhibice jsou reverzibilní (vratné), kdy se enzym váže na enzym jen slabými vazebnými interakcemi, a ireverzibilní (nevratné), kdy se inhibitor váže na enzym kovalentně a modifikuje funkční skupiny.

Reverzibilní inhibice se dále dělí na kompetitivní, akompetitivní a nekompetitivní.

a) Při kompetitivní inhibici se substrát a inhibitor váží oba na aktivní místo enzymu a vzájemně o toto místo soutěží. Kompetitivní inhibitory jsou látky chemicky příbuzné se substrátem. Kompetitivní inhibitor je schopen vazby do aktivního místa, ale není schopen konverze na produkt. Pokud zvýšíme koncentraci substrátu tak, že silně převáží nad koncentrací inhibitoru, kompetitivní inhibice se prakticky odstraní. Sílu interakce inhibitorem a enzymem charakterizuje inhibiční konstanta K_i definovaná jako disociační konstanta komplexu EI.

$$K_i = \frac{[E].[I]}{[EI]}$$

Ki … inhibiční konstanta

[E] … koncentrace enzymu

[I] … koncentrace inhibitoru

[EI] … koncentrace komplexu enzym-inhibitor

b) Při akompetitivní inhibici se inhibitor neváže na volný enzym, ale až na komplex ES.

Tento typ reakcí se vyskytuje u dvousubstrátových reakcí.

$$K_i' = \frac{[ES].[I]}{[ESI]}$$

Ki´… inhibiční konstanta

[ES]… koncentrace komplexu enzym-substrát

[I]… koncentrace inhibitoru

[ESI] … koncentrace komplexu enzym-substrát-inhibitor

c) Při nekompetitivní inhibici se váže substrát na aktivní místo enzymu a inhibitor mimo aktivní místo. Vazba inhibitoru mění konformaci enzymu a zpomaluje tvorbu produktu. Nekompetitivní inhibitory mají chemickou strukturu odlišnou od substrátu. Nadbytkem substrátu nelze inhibici odstranit. Inhibitor interaguje s volným enzymem a komplexem ES se stejnou afinitou, tedy

$$Ki = Ki' \ ^{88, 89)}$$

β-karbolíny inhibují cholinesterasy právě tímto mechanismem, jedná se tedy o nekompetitivní inhibitory. [90)]

3. 11. Metody stanovení inhibiční aktivity látek na ACHE a BUCHE

Existuje mnoho metodik, jež byly pro stanovení aktivity cholinesteras vyvinuty. Mezi nejčastěji používané jsou řazeny metody elektrometrické, titrační, kolorimetrické, měření změny pH s využitím indikátoru, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, polarografické a enzymové. Výše uvedené metody, s výjimkou kolorimetrické, však nemohou být zavedeny do rutinní praxe z mnoha

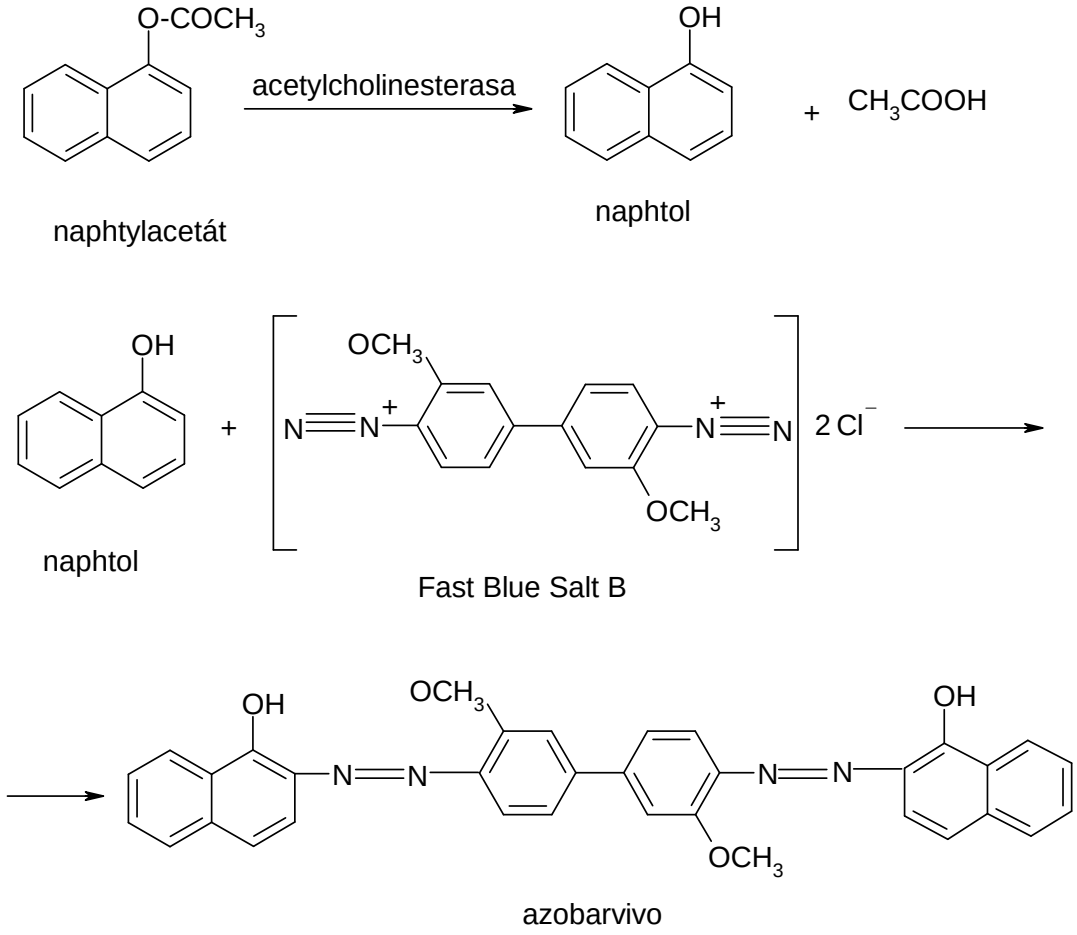
důvodů, zvláště pak náročné úpravy vzorku, dlouhé doby měření nebo nedostatečné specificity enzymu k substrátu. [91)]

Ke stanovování inhibiční aktivity látek na ACHE a BUCHE byly v této práci použity 2 testy – „Fast Blue B salt“ test a Ellmanův test. Oba tyto testy patří mezi kolorimetrické metody a lze je provádět na TLC desce (pro první předběžné zjištění, zda má látka inhibiční aktivitu) nebo se měří absorbance roztoku v kyvetě pomocí spektrofotometru (pro přesné zjištění inhibiční aktivity).

3. 11. 1. Test „Fast Blue B salt“

Tento test je založen na reakci kyseliny α-naftyloctové (substrátu) s ACHE nebo BUCHE (enzymy) a následnou reakcí vzniklého α-naftolu s „Fast Blue B salt“. Produktem reakce je purpurově zbarvené azobarvivo. [92)] V této práci byl tento test proveden na TLC desce. Výsledkem reakce je zbarvení desky do purpurova. Pokud je na desce nanesen inhibitor, v místě jeho výskytu zůstane bílá skvrna.

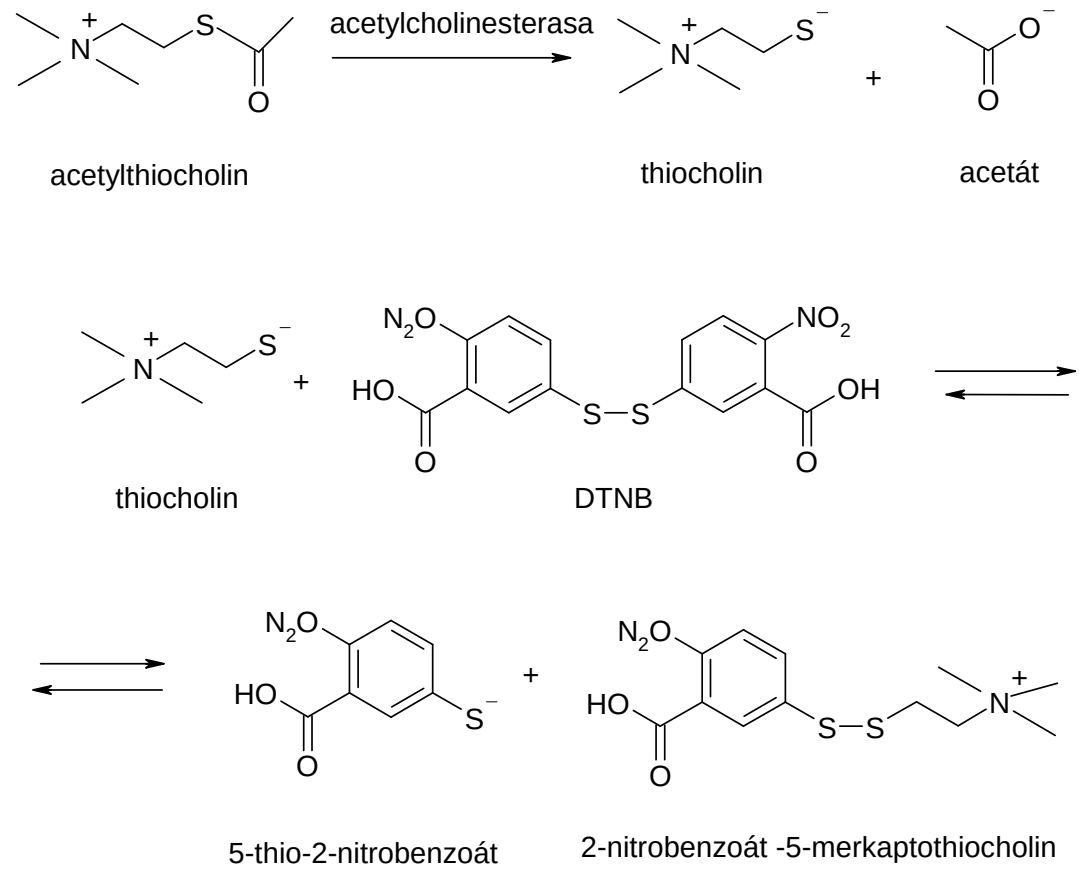
Obr. č. 5: Reakce „Fast Blue B salt“ [92)]



3. 11. 2. Ellmanův test

Tento test je založen na reakci acetylthiocholin jodidu (ATCHI) nebo butyrylthiocholin jodidu (BUTCHI) (substráty) s enzymem ACHE nebo BUCHE. Reakcí vzniklý thiocholin dále reaguje s 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB) za vzniku 5-merkapto-2-nitrobenzoátového aniontu (TNB^-), který se projeví vznikem žlutého zbarvení. [91, 93)] Tento test byl proveden metodou měření změny absorbance roztoku pomocí spektrofotometru. V přítomnosti inhibitoru v roztoku jsou hodnoty změny absorbance nižší a žluté zabarvení roztoku méně intenzivní.

Obr. č. 6.: Reakce Ellmanova testu [91, 93)]



4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. 1. Chemikálie a přístroje

4. 1. 1. Chemikálie

- acetylcholinesterasa z *Electrophorus electricus* (electric eel), 0,77 mg, 658 U/mg, 1210 U/mg proteinu, typ V-S; acetylthiocholin jodid ≥ 99 %; α-naftyloctová kyselina ≥ 98%; bovinní sérový albumin 98%; butyrylcholinesterasa z koního séra, 526,32 mg, 11,4 U/mg, 19 U/mg proteinu; butyrylthiocholin jodid ≥ 98%; dimethylsulfoxid ≥ 99,6%; 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) 99 %; eserin; eserin salicylát ≥ 97%; „Fast Blue B salt“ 95%; harmalin p. a.; harmalin hydrochlorid 95%; harman 98%; harmin ≥ 98%; harmalol hydrochlorid dihydrát ≥ 98%; norharman krystalický; norharman hydrochlorid krystalický - Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- aceton p. a.; diethylether p. a.; dihydrogenfosforečnan draselný p. a.; dodekahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného p. a.; etanol 96%; kyselina chlorovodíková 36%; kyselina octová 99%; methanol p. a.; octan sodný tavený p.a. - Pinta, Chrudim

4. 1. 2. Přístroje

- analytické váhy CPA-225D-OC, SARTORIUS, Göttinger
- HPLC chromatograf JASCO (čerpadlo PU-2089, autosampler AS-2055, detektory MD-2015 a FP-2020), Jasco International, Tokyo
- termostat kolony JETSTREAM II PLUS, Langenzersdorf
- chromatografická kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5µm) s předklonkou, Merc Darmstadt
- mikrostříkačka Hamilton, Fisher Scientific, Hampton

- pH metr ACIDIMETR 333, DRUOPTA, Praha
- spektrofotometr SHIMADZU UV-1601, SCHIMADZU, Kyoto
- termostat ISOTEMP 125 D, Fisher Scientific, Ottawa
- vakuová rotační odparka LABOROTA 4002, Heildoph, Schwabach
- vodní lázeň KL, Laboratorní přístroje, Praha
- sušárna Memmert 500, Memmert, Schwabach
- světelný mikroskop Olympus CX31,Olympus Comporation, Tokyo

4. 2. Rostlinný materiál

4. 2. 1. Lokality sběru

Rostlinný materiál byl sbírán v období duben – září na jednotlivých vodních tocích. Mech *Fontinalis antipyretica* byl identifikován na základě botanického popisu a mikroskopického pozorování. [3, 4)]

Lokality sběru *Fontinalis antipyretica* byly vytipovány na základě mapy uvedené na webových stránkách Českého hydrometeorologického ústavu. [7)] Byly vytipovány lokality Labe v Debrném [94)] a Metuje nedaleko obce Rychnovek. [95)] Zkoumána byla také Tichá Orlice v Kunčicích. [96)] Na základě ústních sdělení a vlastního průzkumu byly objeveny další dvě lokality – Dědina v Ledcích a Rokytenka v Kunvaldu.

4. 2. 2. Zpracování rostlinného materiálu

Vzorky byly po sběru nejprve vysušeny filtračním papírem a následně dosušeny v sušárně při 50°C. Poté byly rozemlety a uchovávány v tmavých stojatkách se zábrusem.

4. 2. 3. Ztráta sušením, celkový popel a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové

4. 2. 3. 1. Ztráta sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech (m/m).

Do váženky předem vysušené za podmínek předepsaných pro zkoušku se navážil 1 g upráškované drogy. Droga se sušila 1 hodinu v sušárně při 105°C. Poté se váženky s drogou nechaly vychladnout v exsikátoru a zvážily se. [97)] Ztráta sušením se vypočítala podle vzorce:

$$\frac{hmotnost\ před\ sušením - hmotnost\ po\ sušení}{navážka} . 100$$

4. 2. 3. 2. Celkový popel

Křemenný kelímek se žíhal 30 min do červeného žáru, nechal se vychladnout v exsikátoru a zvážil se. Poté se do kelímku navážil 1 g upráškované drogy. Kelímek se sušil 1 h v sušárně při 105°C a poté se žíhal 40 minut v muflové peci při 625°C. [97)] Celkový popel se vypočítal podle vzorce:

$$\frac{hmotnost\ popela}{navážka} . 100$$

4. 2. 3. 3. Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové

Je to podíl získaný po extrakci síranového nebo celkového popela kyselinou chlorovodíkovou R přepočítaný na 100 g drogy.

Do kelímku obsahujícího zbytek po stanovení celkového popela se přidalo 7,5 ml vody R a 5 ml HCl. Kelímek se přikryl hodinovým sklem a mírně se zahříval na vodní lázni 10 minut. Po ochlazení se obsah kelímku zfiltroval bezpopelným filtrem, zbytek na filtru se promyl teplou destilovanou vodou do neutrální reakce filtrátu. Filtrační papír se poté v kelímku vysušil, spálil a po vychladnutí v exsikátoru se zvážil. [97)]

4. 3. HPLC

Pro HPLC analýzu byly připravovány vždy dva extrakty, methanolový a acetonový.

4. 3. 1. Příprava vzorků

8 g sušené upráškované drogy se smíchalo s 50 ml methanolu (acetonu) a nechalo se macerovat za pokojové teploty 72 hodin (3 dny). Poté se extrakt zfiltroval přes vatu a droga spolu s vatou se ještě několikrát promyly methanolem (acetonem), dokud nebyl vytékající filtrát čirý. Methanolový (acetonový) extrakt se na vakuové odparce zahustil zhruba na 50 ml a přelil se do dělící nálevky. K extraktu se přidalo 50 ml éteru a třikrát se vytřepávalo s 15 ml roztoku 2% kyseliny octové. Spojené kyselé výtřepky se odpařily na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustil ve 4 ml destilované vody a poté se přefiltroval mikrofiltrem 0,4 µm. [98)]

4. 3. 2. HPLC analýza

HPLC metoda pro stanovení β-karbolínových alkaloidů byla vytvořena na základě experimentů provedených týmem Louise E. D. a kol.. [99)]

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, fluorescenční detektor FP-2020, autosampler AS-

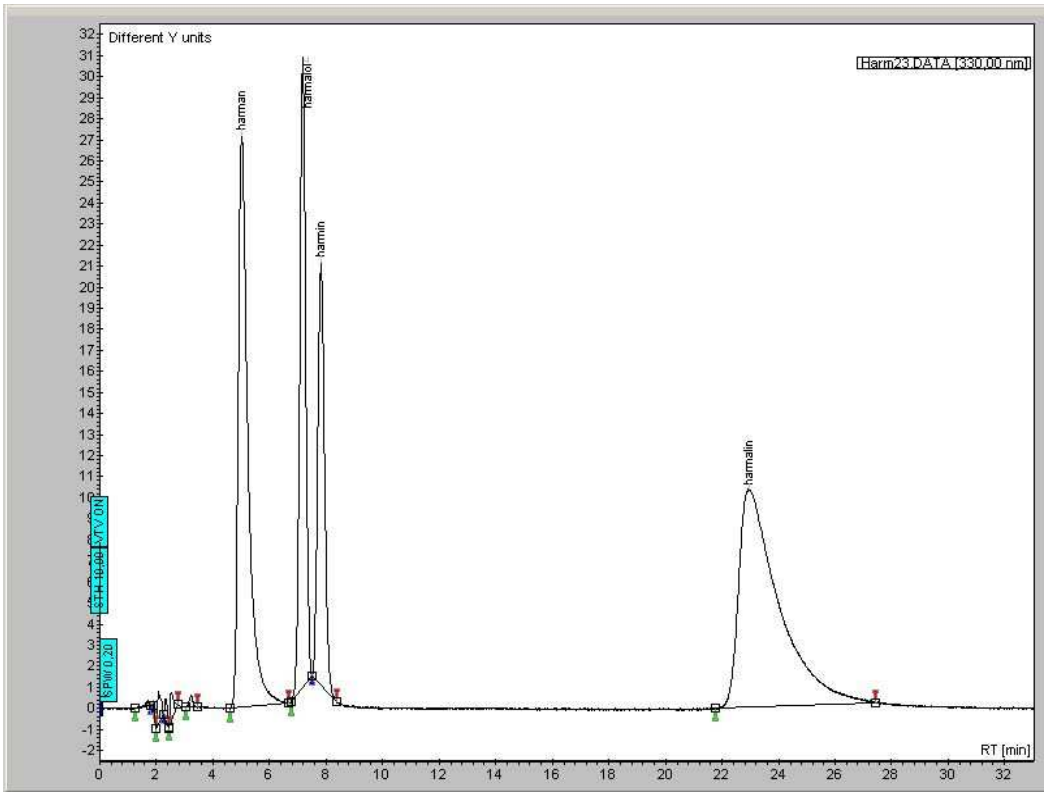
2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5µm) s ochranou předkolonkou. Analýzy probíhaly 33 min.

Pro HPLC analýzu byla zvolena izokratická eluce. Mobilní fáze se skládala ze 70% z methanolu a ze 30 % z fosfátového pufru pH 7,8 (fosfátový pufr o síle 50 mM, připravený z 0,3312 % (hm./obj.) KH_2PO_4 a 0,8509 % hm./obj. Na_2HPO_4 . 12 H_2O)

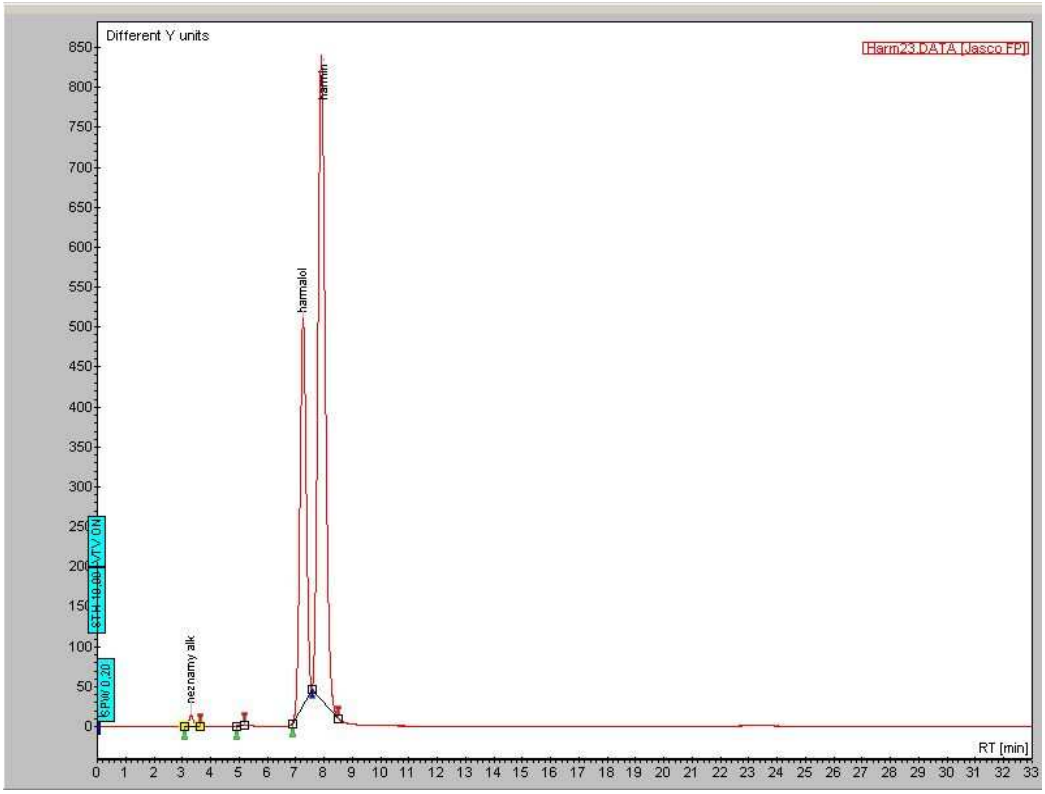
Průtok mobilní fáze v průběhu analýzy se zvyšoval z 1,1 ml/min v čase 0 do 1,5125 ml/min v čase 33 min.

Detekce probíhala na DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 - 480 nm, na fluorescenčním (FP) detektoru při extinkční vlnové délce 300 nm a emisní 435 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků z FP detektoru při vlnové délce při 330 nm.

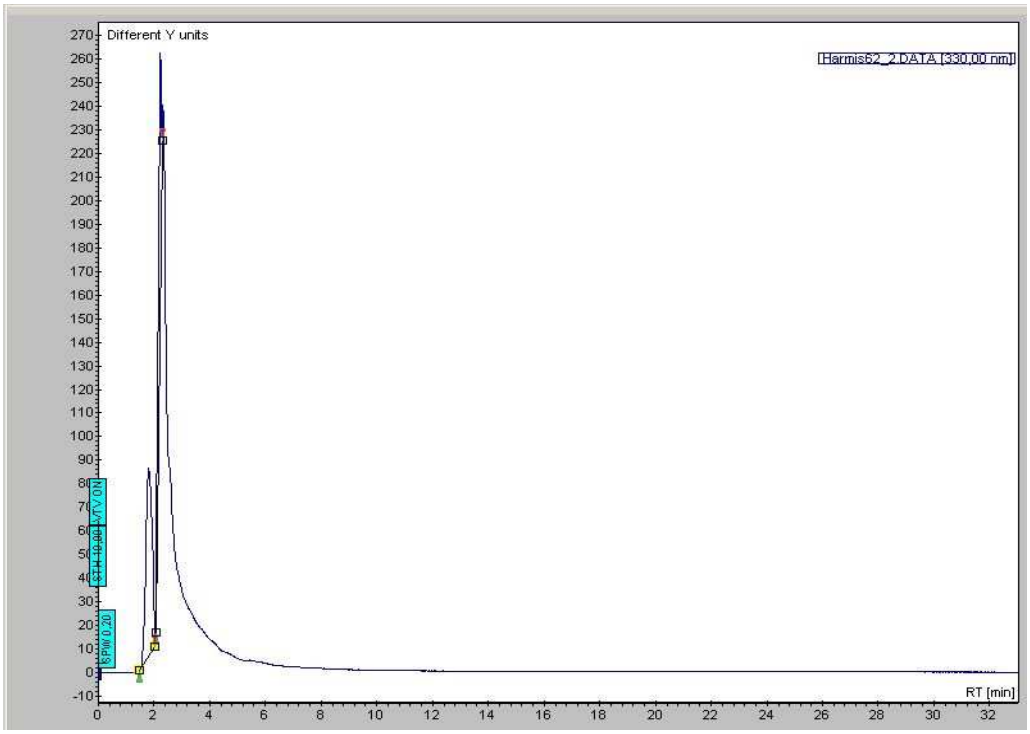
Obr. č. 7: Ukázka chromatogramu standardů alkaloidů na fluorescenčním detektoru; harman RT = 5 min, harmalol RT = 7 min 12 s, harmin RT = 7 min 54 s, harmalin RT = 22 min 54 s



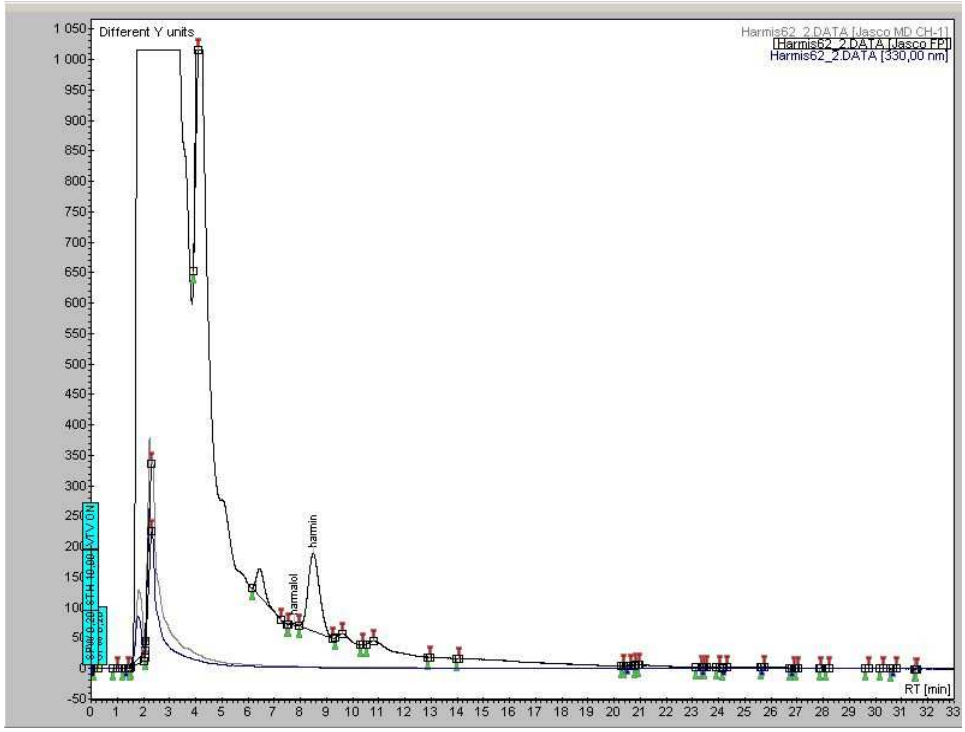
Obr. č. 8: Ukázka chromatogramu standardů alkaloidů na DAD detektoru; harmalol RT = 7 min 12 s, harmin RT = 7 min 54 s



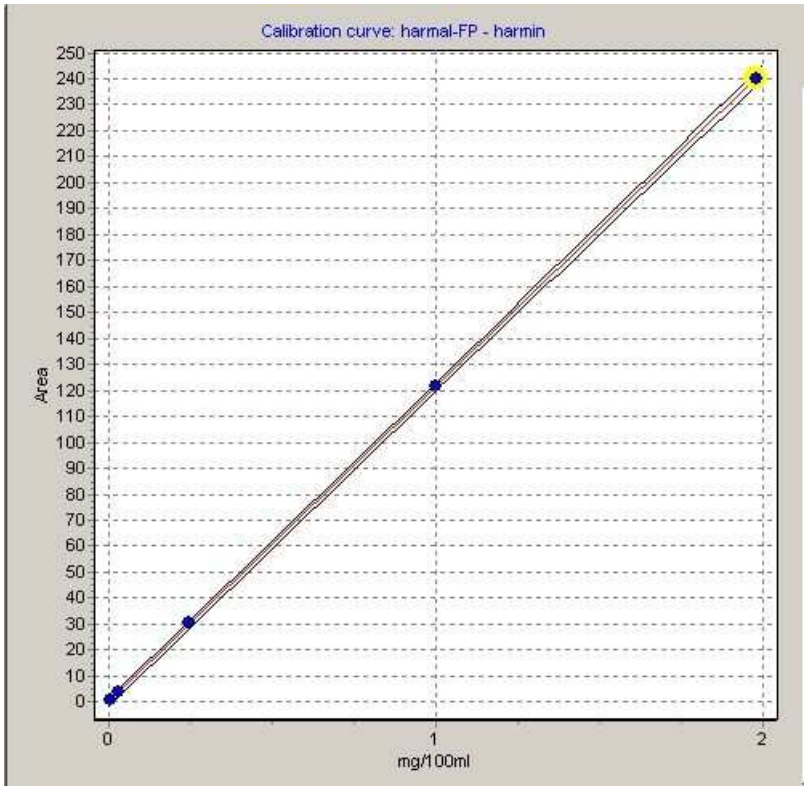
Obr. č. 9: Ukázka chromatogramu vzorku methanolového extraktu s použitím DAD detektoru



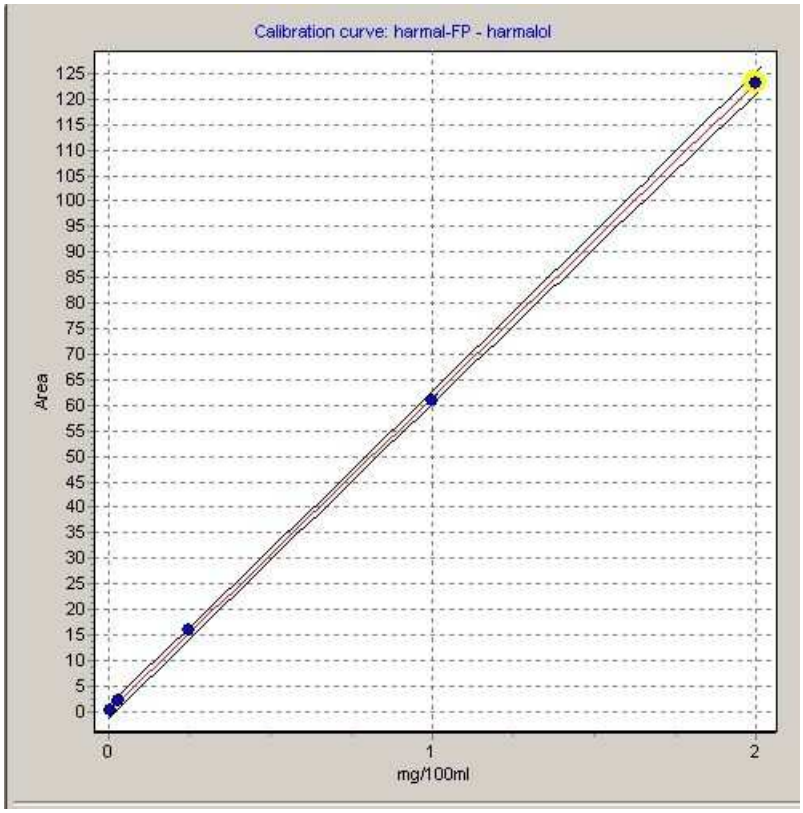
Obr. č. 10: Ukázka chromatogramu vzorku methanolového extraktu s použitím fluorescenčního detektoru; harmalol RT = 7 min 12 s, harmin RT = 7 min 54 s



Obr. č. 11: Kalibrační křivka harminu



Obr. č. 12: Kalibrační křivka harmalolu



4. 3. 3. Validace HPLC

Validace znamená ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody).

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco) a to normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. test na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearity (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r, která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 4. vydání [100]: Asymetrie píku a Počet teoretických pater.

Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

Správnost metody - jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem).

Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %). [101 - 103)]

4. 4. Stanovení inhibiční aktivity β-karbolínových alkaloidů a extraktů na ACHE a BUCHE (test „Fast Blue B salt“, Ellmanův test)

4. 4. 1. Příprava

4. 4. 1. 1. Příprava solí alkaloidů

Soli harman hydrochlorid a harmin hydrochlorid nebyly komerčně dostupné, musely být tedy připraveny v laboratoři.

Harman (harmin) se rozpustil v malém množství 96% ethanolu. Poté se k roztoku přidala 36% HCl, roztok se zahřál, za horka přefiltroval a následně odpařil na vodní lázni. Vzniklé krystaly se několikrát promyly etherem a vysušily na vodní lázni dosucha.

Báze harmalolu také nebyla komerčně dostupná. Bohužel se však harmalol z harmalolu hydrochloridu nepodařilo připravit.

4. 4. 1. 2. Příprava roztoků

Koncentrace roztoků byly zvoleny na základě experimentů, které byly provedeny vědeckými týmy Martson A. a kol., [92)] Nino J. a kol. [104)] a Darvesh S. a kol.. [105)]

Roztoky alkaloidů, methanolového a acetonového extraktu, ATCHI, BUTCHI, DTNB a roztok pro detekci v testu „Fast Blue B salt“ byly připravovány vždy čerstvé pro každý den měření. Pufr byl připraven, uchováván v lednici a používán po dobu 5 dnů. Roztoky enzymů byly po přípravě zmraženy a v tomto stavu uchovávány po dobu maximálně 6 měsíců (výrobce uvádí, že po tuto dobu si naředěný enzym uchová svou aktivitu). [106)] Byly rozmraženy při pokojové teplotě vždy jen jednou, a to těsně před jejich použitím.

Roztoky alkaloidů a extraktů

Methanolový a acetonový extrakt se připravily již popsaným postupem (viz. kapitola 4. 3. 1.). Pro provedení testu „Fast Blue B salt“ se alkaloidy (harman, harmin, harmalin, harmalol hydrochlorid a norharman) a methanolový extrakt rozpustily v methanolu, acetonový extrakt v acetonu.

Pro stanovení inhibiční aktivity pomocí Ellmanova testu se jednotlivé alkaloidy (eserin, eserin salicylát, harman, harman hydrochlorid, harmin, harmin hydrochlorid, harmalin, harmalin hydrochlorid, harmalol hydrochlorid, norharman a norharman hydrochlorid) rozpustily ve vodě (soli) nebo ve směsi DMSO a vody v poměru 5 ml DMSO a 2,6 ml vody (soli a báze). Tento poměr byl zvolen na základě zkoušky rozpustnosti jednotlivých alkaloidů s tím, že byl použit poměr pro nejméně rozpustný alkaloid, kterým byl harman. Nejvyšší koncentrace roztoků byla 0,01 M a další koncentrace byly ředěny vodou nebo směsí DMSO s vodou na základě výsledků pro vytvoření křivky inhibiční aktivity. Celkový methanolový a acetonový extrakt se rozpustily ve směsi DMSO s vodou v poměru 5 ml DMSO a 2,6 ml destilované vody na nejvyšší koncentraci 20 mg/ml, byly přefiltrovány přes mikrofiltr 0,4 µm a poté byly dále ředěny směsí na potřebné koncentrace.

Roztoky ATCHI, BUTCHI a DTNB

Pro stanovení inhibiční aktivity extraktů a alkaloidů byla použita pro ATCHI a BUTCHI koncentrace roztoků 14 mM. Byly připraveny rozpuštěním ATCHI a BUTCHI v destilované vody.

Roztok DTNB o koncentraci 3 mM byl připraven rozpuštěním DTNB s přídavkem CH_3COONa v destilované vodě. CH_3COONa byl použit pro zlepšení rozpustnosti a zvýšení stability DTNB ve vodě. [104, 107)]

Roztok pro detekci pro test „Fast Blue B salt“

62,5 mg 1-naftylacetátu bylo rozpuštěno ve 25 ml etanolu. 100 mg „Fast Blue B salt“ bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody. Těsně před nanesením na TLC desku se smíchalo 5 ml roztoku 1-naftylacetátu a 20 ml roztoku „Fast Blue B salt“. Roztok byl uchováván v temnu. [92)]

Fosfátový pufr pH 7,9

Fosfátový pufr pH 7,9 byl připraven smísením 92,6 ml roztoku A a 7,4 ml roztoku B. Roztok A se připravil rozpuštěním 4,73 g Na_2HPO_4 . 12 H_2O ve 200 ml destilované vody. Roztok B byl připraven rozpuštěním 0,45 g KH_2PO_4 v 50 ml destilované vody. [108)] V pufru, který byl používán pro práci s ACHE, byl dále rozpuštěn BSA v koncentraci 1 mg/ml, jak je udáno výrobcem. [106)] BSA slouží k udržení stability enzymu. Po přípravě pufru bylo jeho pH ověřeno na pH metru.

Roztoky ACHE a BUCHE

Ředění ACHE

Pro naředění enzymu pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a extraktů byl použit následující postup: Obsah lahvičky (0,77 mg) se nejprve rozpustil v 0,5 ml fosfátového pufru pH 7,9. 0,5 ml bylo dále rozděleno do 20 Eppendorfových mikrozkumavek po 25 µl a každá zkumavka se doplnila týmž pufrem do objemu 0,5 ml. Každá zkumavka se dále rozdělila do 5 mikrozkumavek po 100 µl a každá byla opět doplněna pufrem do 1000 µl. Při posledním ředění se enzym rozdělil po 60 µl do 16 mikrozkumavek a každá byla doplněna pufrem do 1000 µl. Výsledná aktivita ACHE po ředění byla 0,3 U/ml.

Pro přípravu roztoku ACHE pro test „Fast Blue B salt“ byla použita mikrozkumavka s 0,5 ml roztoku enzymu o aktivitě 50,667 U/ml z předcházejícího ředění. Obsah mikrozkumavky se zředil fosfátovým pufrem pH 7,9 na celkový objem 15 ml. Výsledná koncentrace enzymu byla 3,38 U/ml.

Ředění BUCHE

Pro stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a extraktů bylo použito toto ředění: Nejprve se 43,86 mg BUCHE rozpustilo v 1 ml pufru do Eppendorfovy mikrozkumavky. Poté se objem rozdělil do 10 mikrozkumavek po 100 µl a každá se doplnila fosfátovým pufrem pH 7,9 do 1000 µl. Takto se enzym rozředil celkem třikrát. Výsledná koncentrace enzymu po ředění byla 0,5 U/ml.

Pro provedení testu „Fast Blue B salt“ byl pro ředění použit roztok BUCHE o koncentraci 5 U/ml z předcházejícího ředění. Z tohoto roztoku se odebralo 676 µl a doplnilo se fosfátovým pufrem do 10 ml. Výsledná koncentrace roztoku BUCHE byla 3,38 U/ml.

4. 4. 2. Postupy

4. 4. 2. 1. Test „Fast Blue B salt“ na TLC

Celkem byly vytvořeny 4 TLC desky. Všechny byly nejprve vyvinuty acetonem a poté se nechaly volně oschnout na vzduchu. Na první desku se nanesly pomocí mikrostříkačky roztoky eserinu, na druhou roztoky alkaloidů a na třetí a čtvrtou desku roztoky extraktů. Ve výsledku byl na první desce nanesen eserin ve čtyřech různých množstvích (1 – 0,001 µg), na druhé bylo 20 µg harmanu, norharmanu, harminu, harmalinu a harmalolu hydrochloridu, na třetí 15 µg metanolového a acetonového extraktu a na čtvrté 150 µg metanolového a acetonového extraktu. Desky se poté nechaly vyvinout v soustavě $CHCl_3$: MeOH v poměru 9:1. Rozpouštědlo se nechalo volně odpařit. Poté se na desky nanesl roztok ACHE (BUCHE) vytemperovaný v termostatu na 30°C a desky se nechaly volně schnout 5 minut při pokojové teplotě. Následně byl na desky nanesen detekční roztok složený z roztoků kyseliny α-naftyloctové a „Fast Blue B salt“. Po 3 minutách bylo provedeno odečtení výsledků - po reakci se deska zbarvila purpurově a bylo zjišťováno, zda v místech, kde se na desce nacházely alkaloidy, zůstaly bílé skvrny. [92)]

4. 4. 2. 2. Ellmanova metoda

Nejprve se naměřila inhibiční aktivita kontroly. Do zkumavky bylo napipetováno 150 µl ATCHI (BUTCHI), 750 µl DTNB a 150 µl testovaného extraktu nebo alkaloidu v různých koncentracích podle potřeby. Zároveň se připravil do druhé zkumavky kontrolní roztok složený ze 150 µl ATCHI (BUTCHI), 750 µl DTNB a 150 µl rozpouštědla extraktu nebo alkaloidu (vody nebo směsi vody a DMSO). Obě zkumavky se nechali 15 minut inkubovat při 30°C v termostatu. Poté se do první přidalo 150 µl ACHE (BUCHE) a do druhé 150 µl pufru. Roztoky se

přelily do semimikrokyvet a měřila se změna absorbance roztoků při 412 nm po dobu 3 minut.

Podobným způsobem se měřila inhibiční aktivita ve vzorcích Do obou zkumavek se napipetovalo 150 µl ATCHI (BUTCHI), 750 µl DTNB a 150 µl roztoku testovaného extraktu nebo alkaloidu. Do první zkumavky se po 15 minutách inkubace v termostatu přidalo 150 µl ACHE (BUCHE), do druhé 150 µl pufru. Roztoky se přelily do semimikrokyvet a měřila se změna absorbance při 412 nm po dobu 3 minut.

U každého extraktu a alkaloidu bylo dále provedeno měření kontroly proti vodě. Do první zkumavky bylo napipetováno 150 µl ATCHI (BUTCHI), 750 µl DTNB a 150 µl nejvyšší použité koncentrace extraktu nebo alkaloidu, do druhé 1200 µl destilované vody. Po 15 minutách inkubace v termostatu se do první zkumavky přidalo 150 µl pufru a do druhé 150 µl destilované vody, roztoky se přelily do semimikrokyvet a opět se měřila změna absorbance při 412 nm po dobu 3 minut. [104)]

Výsledky byly přeneseny do grafů a byly vytvořeny inhibiční křivky extraktů a jednotlivých alkaloidů a následně zjištěny hodnoty IC_{50}.

4. 5. Detekce alkaloidů pomocí Dragendorffova činidla

Pro důkazovou reakci alkaloidů bylo použito Dragendorffovo činidlo.

4. 5. 1. Příprava činidla

Základní roztok: 0,85 zásaditého dusičnanu bismutitého se rozpustilo ve směsi 40 ml destilované vody a 10 ml koncentrované kyseliny octové. Pak se přidalo 50 ml roztoku KI (500g/l) a třepalo se do rozpuštění.

Včas potřeby se smíchalo 1 ml základního roztoku s 2 ml koncentrované kyseliny octové a 10 ml destilované vody. [108)]

4. 5. 2. Postup

Dvě TLC desky se nechaly vyvinout v acetonu a rozpouštědlo se nechalo volně odpařit. Poté se na jednu desku nanesly roztoky alkaloidů a na druhou roztoky extraktů ve stejném množství jako v testu „Fast Blue B salt“. Desky se nechaly vyvinout v soustavě $CHCl_3$: MeOH v poměru 9:1. Rozpouštědlo se nechalo volně odpařit. Na suché desky se nastříknul Dragendorffův roztok pro detekci. Odečtení výsledků bylo provedeno bezprostředně po provedení nástřiku.

4. 6. Statistické zpracování výsledků

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána podle následujících matematických vztahů:

Aritmetický průměr:

$$x = \frac{\sum_{i=1}^{a} x_i}{a}$$

kde x_i = naměřené hodnoty, a = rozsah souboru

Směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{a} (x - x_i)^2}{a - 1}}$$

kde x = aritmetický průměr, x_i = naměřené hodnoty, a = rozsah souboru [109)]

Faktor pro výpočet specifické absorbance:

Pro správné určení specifické aktivity enzymu musel být do spektrofotometru zadán faktor. Faktor je číslo, které vyjadřuje korekci mezi specifickou aktivitou uvedenou výrobcem enzymu na lahvičce a experimentálně zjištěnou hodnotou. Do výpočtu bylo zahrnuto také zředění enzymu.

$\Delta A/min = \varepsilon . c . l$

$\Delta A/min$ … změna absorbance roztoku za minutu
ε … molární absorpční koeficient
l … délka kyvety

Molární absorpční koeficient (ε = 14,15E-03 $M^{-1}.cm^{-1}$) pro TNB^- byl zjištěn z literatury. [110)]

Výsledný faktor pro ACHE f = 1505,4 a pro BUCHE f = 33,549.

5. VÝSLEDKY

Tab. č. 2: Místa sběru *Fontinalis antipyretica* a jejich lokalizace

Místo sběru	GPS
Dědina (Ledce)	50° 13´42,195´´ N, 16° 2´ 44,736´´ E
Labe (Debrné)	50° 29´44,521´´ N, 15° 44´ 1,942´´ E
Metuje (Rychnovek)	50° 20´ 51,102´´ N, 15° 58´ 33,477´´ E
Rokytenka (Kunvald)	50° 6´ 35,116´´ N, 16° 29´ 28,203´´ E

Tab. č. 3: Ztráta sušením, celkový popel a popel nerozpustný v HCl

Lékopisné zkoušky	Dědina	Labe	Metuje	Rokytenka
ztráta sušením (%)	6,15	6,60	7,56	6,55
celkový popel (%)	19,45	56,92	11,68	70,13
popel nerozpustný v HCl (%)	11,48	30,78	4,94	34,33

Tab. č. 4: Tabulka obsahu alkaloidů ve *Fontinalis antipyretica* (sběr červenec 2009)

řeka	harmalol (%)	harmin (%)	obsah alkaloidů (%)*
Dědina	0	0,0012	0,0012
Labe	0	0,0008	0,0008
Metuje	0,0014	0,0059	0,0073
Rokytenka	0,0006	0,0065	0,0071

*celkový obsah alkaloidů byl vypočten jako součet obsahů harmalolu a harminu

Měření inhibiční aktivity jednotlivých kontrol a koncentrací extraktů bylo provedeno celkem třikrát. Na konci každého měření byla vždy změřena ještě jednou aktivita kontroly z důvodu ověření stability enzymu. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel a GrafPad.

kontrola 1 – 5 = měřený roztok bez přídavku extraktu

extrakt 1 – 5 (c = 20 – 2,5 mg/ml) = měřený roztok s přídavkem extraktu v příslušných koncentracích

kontrola = ověření stability enzymu po každém měření

ΔA/min = změna absorbance roztoku v čase

smodch = směrodatná odchylka

aktivita = aktivita enzymu

Barevné označení v grafech

modré označení = methanolový extrakt

červené označení = acetonový extrakt

log c = logaritmus jednotlivých koncentrací extraktů

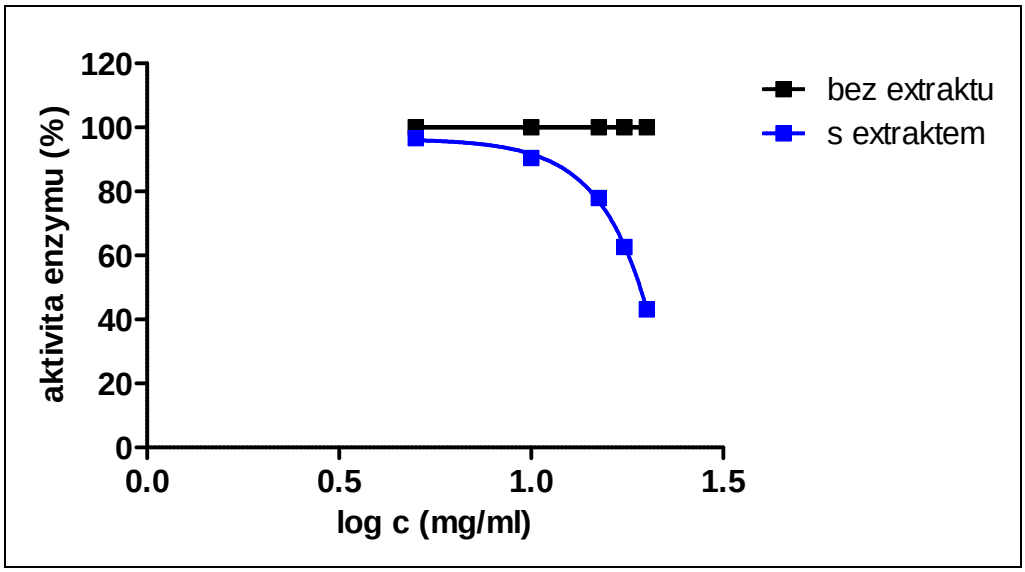
Tab. č. 5: Methanolový extrakt *F. antipyretica* s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1144	2,88	172,1750	100,00
extrakt 1: 20 mg/ml	0,0493	0,30	74,2490	43,14
kontrola	0,1139		171,5200	99,56
kontrola 2	0,1173	2,30	176,5150	100,00
extrakt 2: 15 mg/ml	0,0914	1,53	137,5650	77,92
kontrola	0,1081		162,7500	92,16
kontrola 3	0,1131	0	170,2400	100,00
extrakt 3: 10 mg/ml	0,1023	0,29	153,9900	90,45
kontrola	0,1150		173,1200	101,68
kontrola 4	0,1178	2,29	177,3750	100,00
extrakt 4: 5 mg/ml	0,1139	2,28	171,4900	96,69
kontrola	0,1185		178,3600	100,56
kontrola proti vodě	0	0	0	

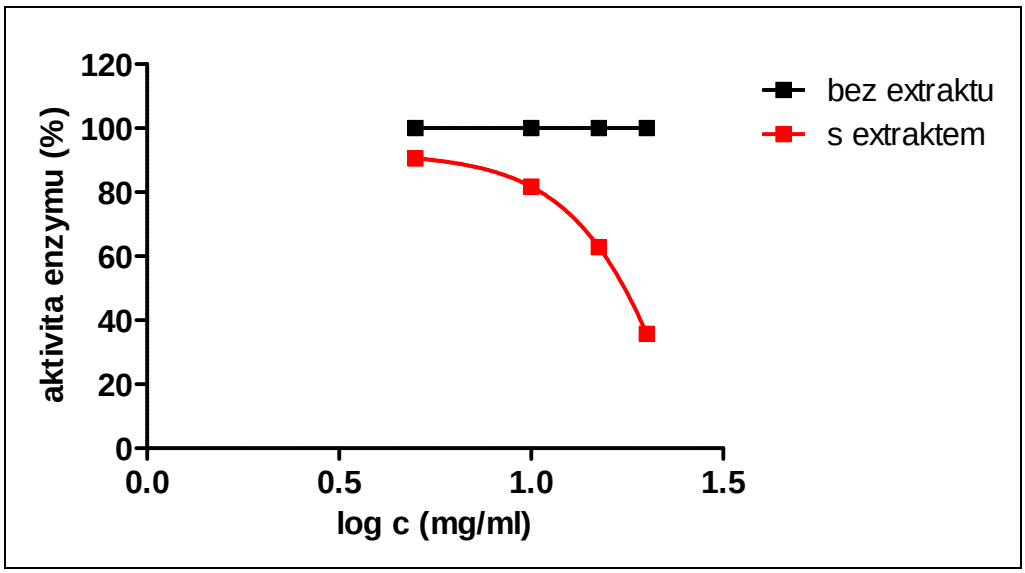
Tab. č. 6: Acetonový extrakt *F. antipyretica* s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1175	3,53	176,7900	100,00
extrakt 1: 20 mg/ml	0,0421	5,59	63,2985	35,80
kontrola	0,1240		186,6500	105,58
kontrola 2	0,1251	0,64	184,3400	100,00
extrakt 2: 15 mg/ml	0,0787	0,70	118,4400	62,87
kontrola	0,1297		195,2300	103,68
kontrola 3	0,1148	0,04	172,7700	100,00
extrakt 3: 10 mg/ml	0,0938	0,21	141,2400	81,74
kontrola	0,1112		167,3700	96,91
kontrola 4	0,1263	0,67	185,9550	100,00
extrakt 4: 5 mg/ml	0,1144	2,84	172,1450	90,57
kontrola	0,1226		184,6100	97,11
kontrola proti vodě	0	0	0	

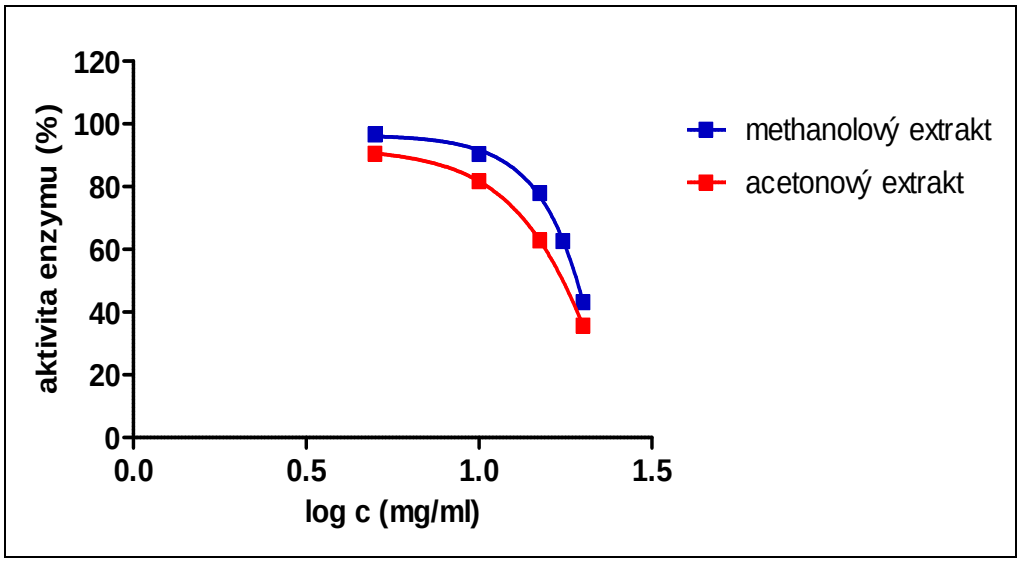
Obr. č. 13: Methanolový extrakt *F. antipyretica* s ACHE



Obr. č. 14: Acetonový extrakt *F. antipyretica* s ACHE



Obr. č. 15: Souhrn inhibiční aktivity extraktů *F. antipyretica* s ACHE



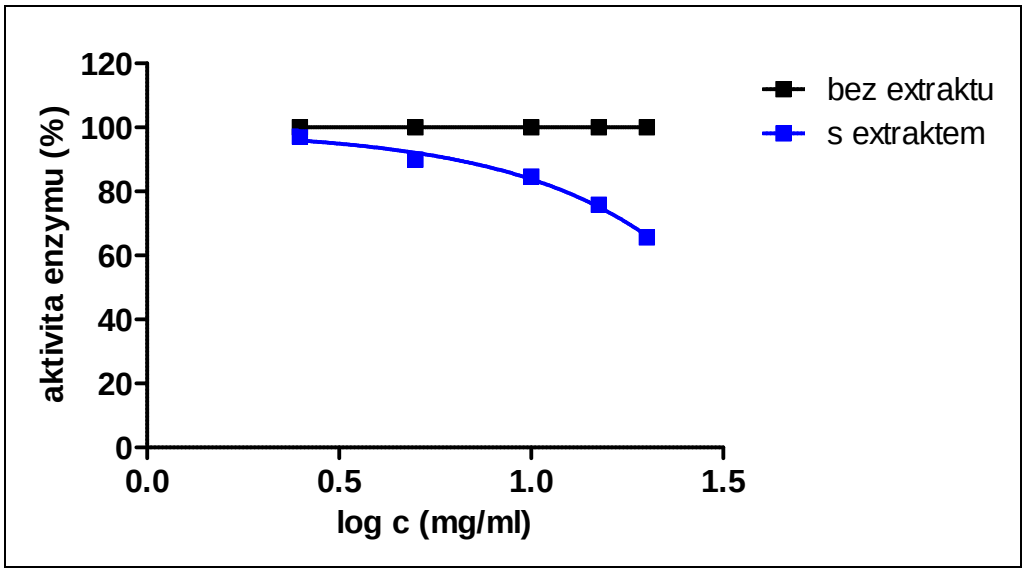
Tab. č. 7: Methanolový extrakt *F. antipyretica* s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2166	2,49	7,2667	100,00
extrakt 1: 20 mg/ml	0,1422	3,97	4,7701	65,63
kontrola	0,2161		7,2500	99,77
kontrola 2	0,2413	3,01	8,0953	100,00
extrakt 2: 15 mg/ml	0,1830	2,95	6,1394	75,85
kontrola	0,2386		8,0048	98,90
kontrola 3	0,2237	1,34	7,4848	100,00
extrakt 3: 10 mg/ml	0,1893	0,85	6,3508	84,62
kontrola	0,2275		7,6324	101,70
kontrola 4	0,2233	0,56	7,4915	100,00
extrakt 4: 5 mg/ml	0,2008	2,02	6,7366	89,92
kontrola	0,2214		7,4277	99,17
kontrola proti vodě	0	0	0	

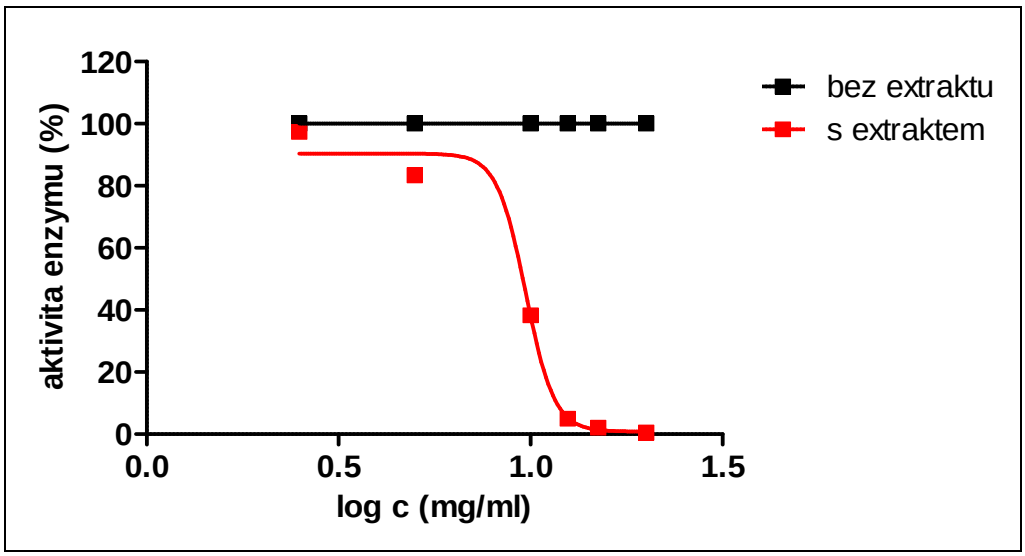
Tab. č. 8: Acetonový extrakt *F. antipyretica* s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2402	1,39	8,0585	100,00
extrakt 1: 20 mg/ml	0,0011	42,86	0,0369	0,44
kontrola	0,2159		7,2432	89,90
kontrola 2	0,2568	0,02	8,6154	100,00
extrakt 2: 15 mg/ml	0,0054	1,85	0,1812	2,10
kontrola	0,2306		7,8773	89,81
kontrola 2	0,2198	3,28	7,3740	100,00
extrakt 2: 12,5 mg/ml	0,0109	0	0,3657	4,96
kontrola	0,2548		8,5483	115,92
kontrola 3	0,2258	2,15	7,5754	100,00
extrakt 3: 10 mg/ml	0,0863	6,43	2,8953	38,21
kontrola	0,2254		7,5619	99,84
kontrola 4	0,2619	0	8,7865	100,00
extrakt 4: 5 mg/ml	0,2131	2,04	7,1493	81,35
kontrola	0,2625		8,8066	100,23
kontrola 5	0,2293	1,33	7,6928	100,00
extrakt 5: 2,5 mg/ml	0,2195	1,71	7,3640	95,73
kontrola	0,2252		7,5552	98,23
kontrola proti vodě	0	0	0	

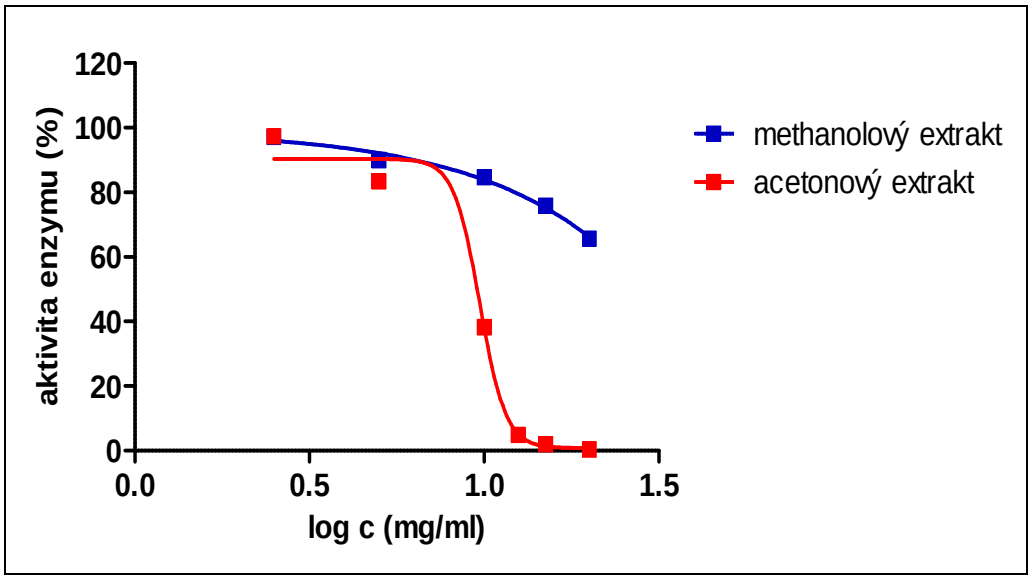
Obr. č. 16: Methanolový extrakt *F. antipyretica* s BUCHE



Obr. č. 17: Acetonový extrakt *F. antipyretica* s BUCHE



Obr. č. 18: Souhrn inhibiční aktivity extraktů *F. antipyretica* s BUCHE



Měření inhibiční aktivity jednotlivých kontrol a koncentrací alkaloidů bylo provedeno celkem třikrát. Na konci každého měření byla vždy změřena ještě jednou aktivita kontroly z důvodu ověření stability enzymu. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel a GrafPad.

kontrola 1 - 6 = měřený roztok bez přídavku alkaloidu

inhibitor 1 - 6 (c = 1E-02 – 1E-07 M) = měřený roztok s přídavkem alkaloidu v příslušných koncentracích

kontrola = ověření stability enzymu po každém měření

ΔA/min = změna absorbance roztoku v čase

smodch = směrodatná odchylka

aktivita = aktivita enzymu

<u>Barevné označení v grafech jednotlivých alkaloidů</u>

modré označení = báze alkaloidů v DMSO/H_2O

červené označení = soli alkaloidů v H_2O

zelené označení = soli alkaloidů v DMSO/H_2O

log c = logaritmus jednotlivých koncentrací alkaloidů

Tab. č. 9.: Eserin v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1169	0,43	176,0250	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0004	71,43	0,5919	0,30
kontrola	0,1158		174,3500	99,06
kontrola 2	0,1199	0,42	180,4650	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0005	11,11	0,6156	0,38
kontrola	0,1184		178,2100	98,75
kontrola 2´	0,0689	0,65	103,5550	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0026	1,96	3,8016	3,70
kontrola	0,0608		102,4300	88,31
kontrola 2´´	0,0815	8,71	122,7050	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,0097	1,55	14,5875	11,84
kontrola	0,0730		109,8600	89,57
kontrola 3	0,1252	0,40	188,4100	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,0482	1,14	72,4670	38,46
kontrola	0,1263		190,1000	100,88
kontrola 3´	0,0835	8,86	125,6600	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,0431	4,30	64,8100	51,56
kontrola	0,0724		108,9600	86,71
kontrola 3´´	0,0881	7,55	132,5700	100,00
alkaloid 3´´: 2,5E-05 M	0,0595	0,08	89,4685	67,52
kontrola	0,0752		113,2500	85,41
kontrola 4	0,1313	2,36	197,6950	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1135	1,85	170,8550	86,44
kontrola	0,1359		204,6500	103,50

kontrola 5	0,1246	0,28	189,0100	100,00
alkaloid 5: 1E-06 M	0,1191	0,59	179,3050	95,62
kontrola	0,1242		186,9900	99,72
kontrola proti vodě	0,0012	4,35	1,6980	

Tab. č. 10: Eserin salicylát v H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,4356	3,96	657,12	100
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0005	0	0,142	0,01
kontrola	0,3873		583,07	88,73
kontrola 1´	0,4413	0,17	665,465	100
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0005	0	0,0931	0,01
kontrola	0,3474		522,92	78,72
kontrola 2	0,3966	0,54	597,04	100
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0005	20	0,7641	0,13
kontrola	0,3873		583,01	97,67
kontrola 2´	0,4165	0,48	626,99	100
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0007	0	1,065	0,17
kontrola	0,3818		574,74	91,67
kontrola 3	0,4195	2,54	631,445	100
alkaloid 3: 1E-04 M	0,0328	24,58	49,319	7,81
kontrola	0,4349		654,65	103,68
kontrola 3´	0,4252	2,26	640,12	100
alkaloid 3´: 5E-05	0,0865	1,79	130,105	20,33
kontrola	0,4453		670,29	104,73
kontrola 3´´	0,3961	0,08	596,275	100
alkaloid 3´´: 2,5E-05 M	0,2163	4,39	325,595	54,61
kontrola	0,4264		641,96	107,65
kontrola 4	0,4208	4,81	633,405	100
alkaloid 4: 1E-05 M	0,3104	1,11	467,235	73,76
kontrola	0,372		560,02	88,41

kontrola 4´	0,4143	3,69	623,715	100
alkaloid 4´: 5E-06 M	0,3453	3,68	519,79	83,35
kontrola	0,4022		605,48	97,08
kontrola 5	0,4474	4,46	673,47	100
alkaloid 5: 1E-06 M	0,4311	2,77	648,885	96,36
kontrola	0,4095		616,42	91,54
kontrola 6	0,4534	4,38	682,45	115,21
alkaloid 6: 1E-07 M	0,3855	1,12	580,33	97,97
kontrola	0,3935		592,31	100
kontrola proti vodě	0,0005	55,56	0,6853	

Tab. č. 11: Eserin salicylát v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1260	0,48	189,6600	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0013	20,00	1,9070	0,99
kontrola	0,1123		169,0100	89,13
kontrola 2	0,1125	3,87	169,2550	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0004	14,29	0,5263	0,31
kontrola	0,1219		183,5100	108,40
kontrola 2´	0,0725	7,80	109,0300	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0006	9,09	0,8784	0,76
kontrola	0,0578		86,9410	79,78
kontrola 2´´	0,0648	10,73	102,2530	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,0065	20,00	9,7891	10,04
kontrola	0,0473		71,2040	73,05
kontrola 3	0,1282	1,79	192,9850	100,00
alkaloid 3: 1E-04	0,0480	5,32	72,1545	37,40
kontrola	0,1278		192,4600	99,69
kontrola 3´	0,0721	12,62	108,5485	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,0375	2,13	56,4165	52,01
kontrola	0,0533		80,2920	73,93
kontrola 4	0,0710	11,27	106,8720	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,0514	0,49	77,3450	72,32
kontrola	0,0603		90,8320	84,93
kontrola 5	0,0698	7,02	105,0695	100,00
alkaloid 5: 1E-06 M	0,0576	0,43	86,6275	82,45
kontrola	0,0592		89,1390	84,81

kontrola 6	0,0784	8,42	118,0600	100,00
alkaloid 6: 1E-07 M	0,0615	1,46	92,5665	78,44
kontrola	0,0646		97,2040	82,40
kontrola proti vodě	0,0024	4,17	3,5737	

Tab. č. 12: Harman v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1100	2,77	165,5550	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0149	0,34	22,4185	13,51
kontrola	0,1068		160,8300	97,14
kontrola 1´	0,1024	3,03	154,1400	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0222	1,13	33,3280	21,63
kontrola	0,1012		152,3400	98,83
kontrola 2	0,1125	0,13	169,2500	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0600	0	90,3245	53,36
kontrola	0,1113		167,5700	98,98
kontrola 2´	0,1058	1,32	159,2850	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0761	3,29	114,5800	71,93
kontrola	0,1145		172,3900	108,22
kontrola 3	0,1042	2,26	156,7700	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,9615	2,76	144,7650	92,32
kontrola	0,1043		156,9900	100,14
kontrola 4	0,1157	0,86	174,1600	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1069	3,74	160,9150	92,39
kontrola	0,1103		166,0800	95,33
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 13: Harman hydrochlorid v H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,4181	5,05	629,4050	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0337	1,93	50,7010	8,05
kontrola	0,3207		482,8400	76,70
kontrola 1´	0,4434	2,05	667,4900	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0541	0,18	81,4105	12,20
kontrola	0,3548		534,0800	80,02
kontrola 1´´	0,4208	0,15	633,4100	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0680	1,55	102,3550	16,40
kontrola	0,3419		514,6300	81,26
kontrola 2	0,3991	1,50	600,7850	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,1194	1,21	179,6550	29,90
kontrola	0,3959		595,9800	99,20
kontrola 2´	0,4152	2,07	625,0650	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1656	1,18	249,2000	39,87
kontrola	0,4142		623,5200	99,76
kontrola 2´´	0,4263	1,98	641,7000	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,2209	1,95	332,5750	51,82
kontrola	0,4332		652,1400	101,63
kontrola 3	0,4417	0,59	664,8900	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,3054	1,78	459,6400	69,13
kontrola	0,4500		675,1200	101,88
kontrola 4	0,4358	2,91	656,0450	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,4094	1,25	616,2600	93,94
kontrola	0,4367		657,3400	100,21
kontrola proti vodě	0,0006	45,45	0,8183	

Tab. č. 14: Harman hydrochlorid DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1169	2,01	175,9250	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0128	2,34	19,2575	10,95
kontrola	0,1120		168,5800	95,85
kontrola 1´	0,1340	5,26	201,6350	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0237	2,11	35,6635	17,69
kontrola	0,1176		177,0300	87,79
kontrola 1´´	0,1439	1,18	216,6600	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0416	2,29	62,5305	28,87
kontrola	0,1305		196,3900	90,69
kontrola 2	0,1129	1,64	169,8750	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0602	3,74	90,5595	53,30
kontrola	0,1126		169,4700	99,78
kontrola 2´	0,1239	2,06	186,3950	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0800	1,06	120,3850	64,55
kontrola	0,1301		195,8900	105,05
kontrola 2´´	0,1290	3,53	194,1250	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1094	2,24	164,6250	84,80
kontrola	0,1295		194,9700	100,43
kontrola 3	0,1313	1,94	197,6100	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1209	0,17	182,0450	92,11
kontrola	0,1334		200,7500	101,64
kontrola 4	0,0672	0	101,1400	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,0626	1,60	94,2080	93,15
kontrola	0,0597		89,9050	88,84
kontrola proti vodě	0,0095	5,26	1,4309	

Tab. č. 15: Harmin DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,0945	0,90	142,2200	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0070	25,18	10,4310	7,36
kontrola	0,0590		88,7690	62,47
kontrola 1´	0,1038	2,36	156,2000	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0105	4,76	15,8065	10,12
kontrola	0,0828		124,6300	79,81
kontrola 1´´	0,0947	3,96	142,4250	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0158	3,80	23,7710	16,69
kontrola	0,0898		135,1800	94,88
kontrola 2	0,0993	2,37	149,4350	100,00
alkaloid 2: 1E-03	0,0323	1,55	48,6180	32,54
kontrola	0,0901		135,6500	90,78
kontrola 2´	0,0968	0,83	145,7200	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0441	4,08	66,3535	45,56
kontrola	0,1009		151,8400	104,24
kontrola 2´´	0,1101	5,36	165,7250	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,0732	1,45	110,1750	66,49
kontrola	0,1210		182,1600	109,90
kontrola 3	0,0993	0,45	149,4400	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,0840	1,25	126,3650	84,58
kontrola	0,1053		158,5700	106,10
kontrola 4	0,1033	1,50	155,4350	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,0962	0,62	140,1600	93,17
kontrola	0,1068		160,8000	103,44
kontrola proti vodě	0,0027	25,93	4,0414	

Tab. č. 16: Harmin hydrochlorid v H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,4846	0,14	729,5350	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0491	10,59	73,8445	10,13
kontrola	0,2797		421,0700	57,72
kontrola 1´	0,4617	4,32	695,0000	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0521	1,54	78,4135	11,29
kontrola	0,3380		650,5700	73,22
kontrola 1´´	0,4363	0,93	656,7000	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0651	0,77	98,0360	14,92
kontrola	0,3478		523,5400	79,72
kontrola 2	0,3621	3,71	545,0350	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0810	1,05	121,7900	22,36
kontrola	0,3786		570,0200	104,57
kontrola 2´	0,4294	1,09	646,4250	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1143	0	172,0800	26,62
kontrola	0,4274		643,3400	99,53
kontrola 3	0,4550	1,46	684,8350	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2334	0,17	351,4000	51,30
kontrola	0,4703		707,9300	103,37
kontrola 3´	0,4633	0,25	697,3650	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,2856	0,91	429,9750	61,65
kontrola	0,4489		675,7400	96,90
kontrola 4	0,4532	1,92	682,1800	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,4050	1,01	609,6750	89,36
kontrola	0,4501		677,5600	99,32

kontrola 5	0,2641	6,00	397,5250	100,00
alkaloid 5: 1E-06 M	0,2355	0,74	354,4300	89,17
kontrola	0,2350		353,7600	89,00
kontrola proti vodě	0,0310	10,97	46,6800	

Tab. č. 17: Harmin hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1300	1,58	195,6300	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0082	0	12,2905	6,31
kontrola	0,1199		180,5000	92,27
kontrola 1´	0,1114	3,59	167,6800	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0119	0	17,9305	10,68
kontrola	0,1123		168,9800	100,81
kontrola 2	0,1108	7,40	166,8200	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0373	2,28	56,0770	33,62
kontrola	0,1267		190,8000	114,35
kontrola 2´	0,1206	0,58	181,5850	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0528	0,38	79,4910	43,78
kontrola	0,1190		179,1300	98,67
kontrola 2´´	0,1195	1,38	179,8100	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,0694	0,72	104,4450	58,10
kontrola	0,1174		176,6800	98,28
kontrola 3	0,1238	0,89	186,3700	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,0930	2,31	139,9150	75,08
kontrola	0,1238		186,3600	100,00
kontrola 4	0,1268	0,75	190,9450	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1187	2,23	178,6250	93,61
kontrola	0,1257		189,1900	99,17
kontrola proti vodě	0,0007	42,86	1,0422	

Tab. č. 18: Harmalin v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1138	0,11	171,2450	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0013	4,00	1,8776	1,10
kontrola	0,0994		149,6600	87,38
kontrola 1´	0,1019	1,57	153,3700	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0055	13,76	8,1718	5,35
kontrola	0,0989		148,9300	97,06
kontrola 1´´	0,0994	3,72	148,3000	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0204	3,92	30,7020	20,52
kontrola	0,0957		144,6000	96,28
kontrola 2	0,0975	6,97	157,0800	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0423	0,36	63,5645	43,33
kontrola	0,1088		163,7300	104,31
kontrola 2´	0,1058	4,35	159,2800	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0565	2,65	85,1145	53,40
kontrola	0,1066		160,4200	100,76
kontrola 3	0,1033	2,66	155,4350	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,0898	1,73	135,1050	86,92
kontrola	0,1006		151,3900	97,43
kontrola 4	0,1128	3,68	169,7150	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1072	1,45	161,3550	95,03
kontrola	0,1093		164,4800	96,94
kontrola proti vodě	0,0003	0	0,0364	

Tab. č. 19: Harmalin hydrochlorid v H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,3507	2,38	527,8500	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0038	36,00	5,6679	1,07
kontrola	0,3623		545,4700	103,32
kontrola 1´	0,3879	4,00	583,9500	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0057	3,51	8,5912	1,47
kontrola	0,3435		517,0600	88,55
kontrola 1´´	0,3853	0	580,0700	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0486	7,20	73,1250	12,61
kontrola	0,3915		589,4000	101,61
kontrola 2	0,4091	2,80	615,7650	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,1119	3,49	168,4500	27,36
kontrola	0,3878		583,7200	94,81
kontrola 2´	0,3911	1,05	588,7400	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1430	0,45	215,3100	36,55
kontrola	0,3950		594,0000	101,00
kontrola 2´´	0,3917	3,97	589,5500	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,2140	1,54	322,1600	54,64
kontrola	0,3936		592,4600	100,50
kontrola 3	0,4484	2,49	674,7100	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,3039	2,70	457,4700	67,78
kontrola	0,4595		691,9700	102,49
kontrola 3´	0,4277	1,39	643,7550	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,3306	0,68	497,6400	77,29
kontrola	0,4164		626,8300	97,37

kontrola 4	0,4116	1,82	619,6450	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,3998	5,03	601,8600	97,13
kontrola	0,4198		631,9500	101,99
kontrola proti vodě	0,0031	41,94	4,6190	

Tab. č. 20: Harmalin hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1226	3,92	184,5950	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0018	25,71	2,1345	1,06
kontrola	0,1248		187,8800	101,79
kontrola 1´	0,1786	0,81	268,7700	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0051	14,85	7,5501	2,83
kontrola	0,1853		278,9900	103,78
kontrola 1´´	0,1928	0,26	290,1900	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0300	3,84	45,1040	15,53
kontrola	0,1919		288,9200	99,53
kontrola 2	0,1219	3,90	183,4800	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0477	3,88	71,7395	37,59
kontrola	0,1300		195,7800	106,69
kontrola 2´	0,2105	1,16	316,8400	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1271	0,67	191,2450	60,37
kontrola	0,1735		261,2300	82,44
kontrola 3	0,1276	2,94	192,0550	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1058	1,09	159,1550	83,81
kontrola	0,1225		184,4900	96,04
kontrola 4	0,1707	2,87	249,5000	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1403	1,96	211,1350	82,16
kontrola	0,1558		239,1200	91,27
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 21: Harmalol hydrochlorid v H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,3239	1,74	487,5300	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0013	92,00	1,8867	0,39
kontrola	0,2593		390,4300	80,07
kontrola 1´	0,3023	1,54	455,0550	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0070	28,57	10,5197	2,32
kontrola	0,2704		407,0800	89,46
kontrola 2	0,3880	3,72	583,9900	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,1369	1,02	206,0950	35,29
kontrola	0,3886		585,0400	100,17
kontrola 2´	0,4166	0,42	627,0500	100,00
alkaloid 2´: 5E-04	0,2217	1,92	333,7000	53,21
kontrola	0,4207		633,2600	101,00
kontrola 3	0,3544	0,37	533,4700	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2839	1,66	427,3600	80,11
kontrola	0,3557		535,4700	100,37
kontrola 4	0,4049	2,45	609,5700	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,4119	3,12	620,0250	101,72
kontrola	0,4112		618,9700	101,56
kontrola proti vodě	0	0	0,0364	

Tab. č. 22: Harmalol hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1466	1,60	220,5800	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0025	24,00	3,7642	1,71
kontrola	0,1327		199,7800	90,55
kontrola 1´	0,1382	3,98	208,0150	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0043	5,88	6,3442	3,08
kontrola	0,1362		204,9800	98,55
kontrola 1´´	0,1209	2,73	182,0250	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0127	3,56	19,0940	10,46
kontrola	0,1322		198,9400	109,35
kontrola 2	0,1322	0,68	199,0350	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0635	1,97	95,5310	48,00
kontrola	0,1307		196,7200	98,87
kontrola 2´	0,1182	3,13	177,9450	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0805	1,99	121,2000	68,10
kontrola	0,1266		190,5400	107,11
kontrola 2´´	0,1274	1,65	191,8050	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,0997	0,15	150,0350	78,22
kontrola	0,1308		196,8800	102,67
kontrola 3	0,1324	1,89	199,2550	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1224	1,55	184,2650	92,45
kontrola	0,1347		202,8000	101,74
kontrola 4	0,1374	0,51	206,8300	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1274	2,51	191,8450	92,72
kontrola	0,1376		207,2100	100,15
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 23: Norharman v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1197	0,79	180,1500	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0451	0,44	67,8050	37,69
kontrola	0,1246		187,5500	104,14
kontrola 1´	0,1208	1,20	181,7750	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0613	2,37	92,1430	50,72
kontrola	0,1399		210,5900	115,86
kontrola 2	0,1322	0,19	198,9600	100,00
alkaloid 2: 1E-03	0,1102	0,41	165,8250	83,35
kontrola	0,1300		195,6800	98,37
kontrola 2´	0,1161	1,29	174,7450	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1190	0,04	179,0900	92,64
kontrola	0,1284		193,2200	100,00
kontrola 3	0,1247	0,72	187,7050	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1181	2,24	177,7550	94,67
kontrola	0,1220		183,6300	97,83
kontrola 4	0,1289	1,16	194,0400	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1286	1,48	193,5900	99,77
kontrola	0,1309		197,0300	101,55
kontrola proti vodě	0,0036	0	5,4145	

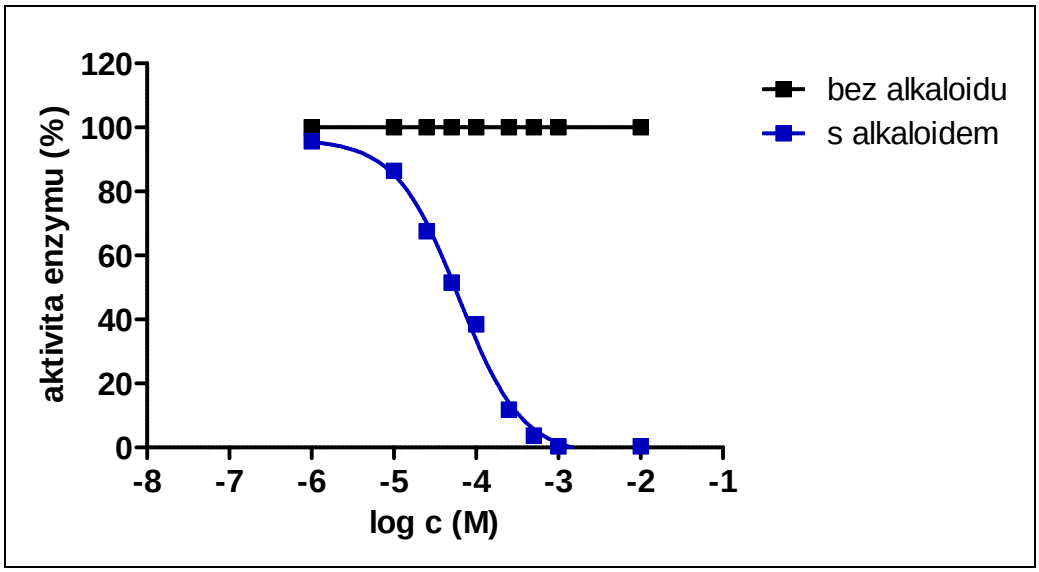
Tab. č. 24: Norharman hydrochlorid v H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,4601	0,24	691,0700	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0458	1,97	68,9835	9,95
kontrola	0,3812		585,9100	82,85
kontrola 1´	0,4596	1,15	691,9450	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0830	0,48	124,9000	18,06
kontrola	0,4452		670,2500	96,87
kontrola 2	0,4246	1,17	639,1000	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,2043	1,10	307,4700	48,11
kontrola	0,4429		666,7600	104,32
kontrola 2´	0,4522	1,02	680,8000	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,3200	0,44	481,7300	70,77
kontrola	0,4404		662,9800	97,39
kontrola 3	0,4300	2,29	647,2650	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,3899	1,22	586,9450	90,67
kontrola	0,4404		663,0500	102,43
kontrola 4	0,4574	0,60	688,5050	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,4484	1,43	675,0700	98,04
kontrola	0,4609		693,8200	102,79
kontrola proti vodě	0,0005	60,00	0,7706	

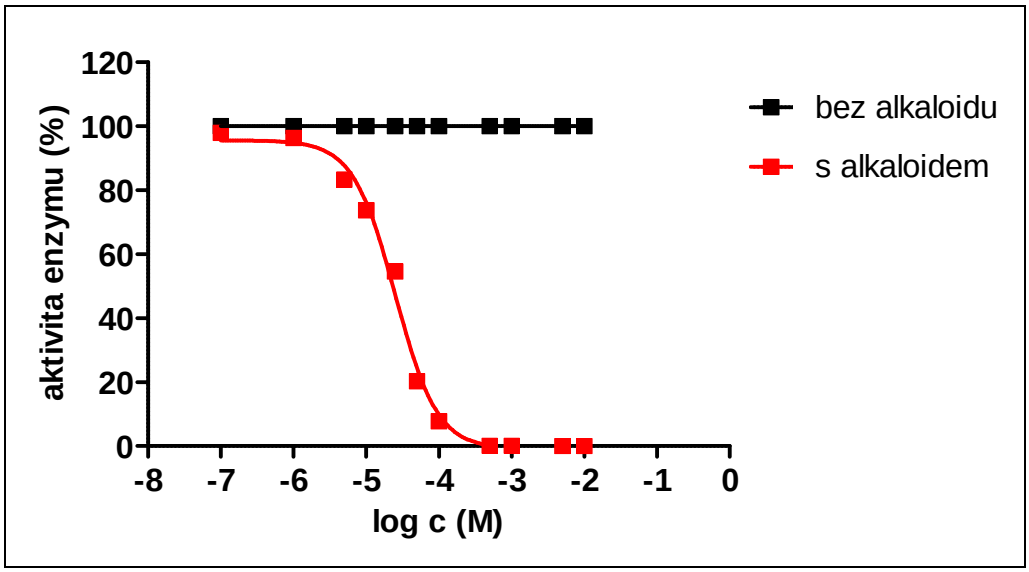
Tab. č. 25: Norharman hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1261	1,55	189,7750	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0363	3,45	54,5880	28,76
kontrola	0,1241		186,8800	98,45
kontrola 1´	0,1232	1,58	185,4350	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0595	1,09	89,4710	48,27
kontrola	0,1247		187,6900	101,26
kontrola 1´´	0,1164	0,56	175,1250	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0681	3,52	102,5605	58,53
kontrola	0,1164		175,2200	100,04
kontrola 2	0,1317	0,61	198,2600	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,1041	1,63	156,7100	79,04
kontrola	0,1261		189,8600	95,75
kontrola 2´	0,1160	0,65	174,5700	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0990	1,97	148,9450	85,34
kontrola	0,1256		189,0300	108,32
kontrola 3	0,1280	1,45	192,6250	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1231	0,93	185,2550	96,17
kontrola	0,1284		193,3500	100,35
kontrola proti vodě	0,0013	0	1,9083	

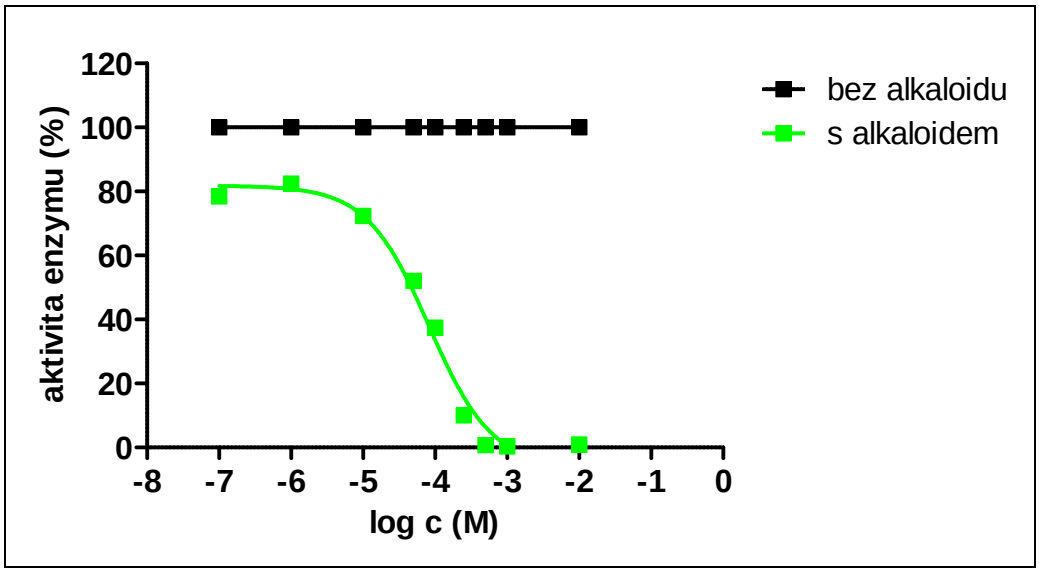
Obr. č. 19: Eserin v DMSO/H_2O s ACHE



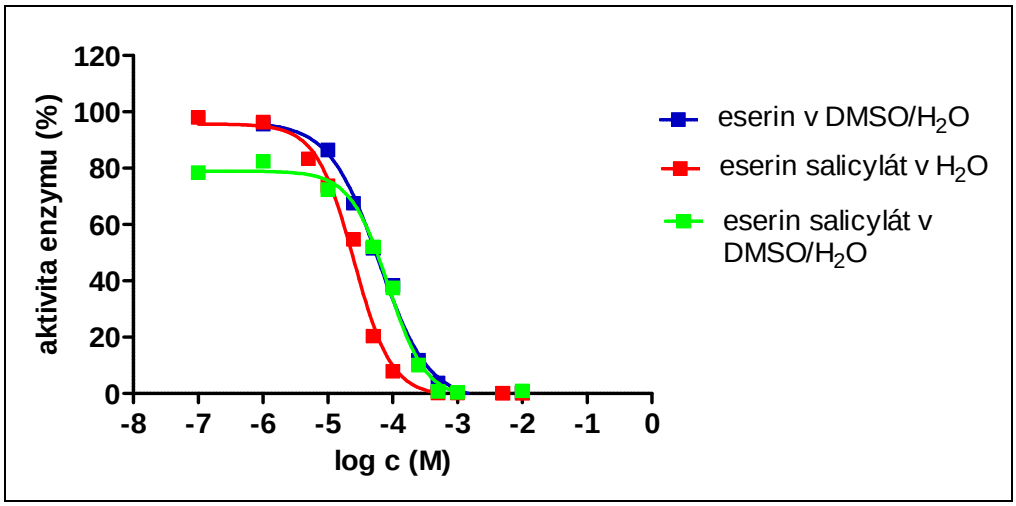
Obr. č. 20: Eserin salicylát v H_2O s ACHE



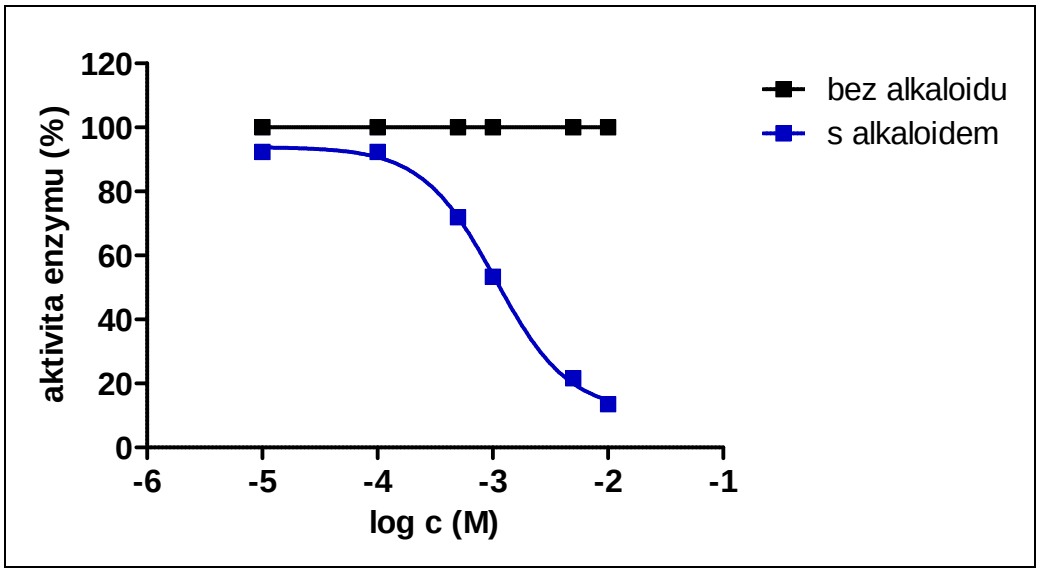
Obr. č. 21: Eserin salicylát v DMSO/H_2O s ACHE



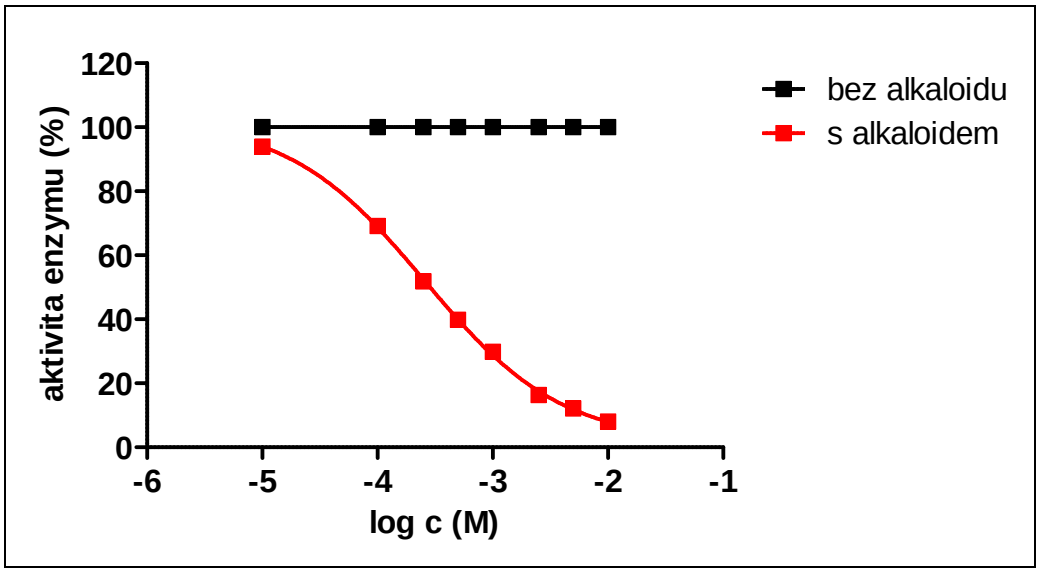
Obr. č. 22: Souhrn inhibiční aktivity eserinu s ACHE



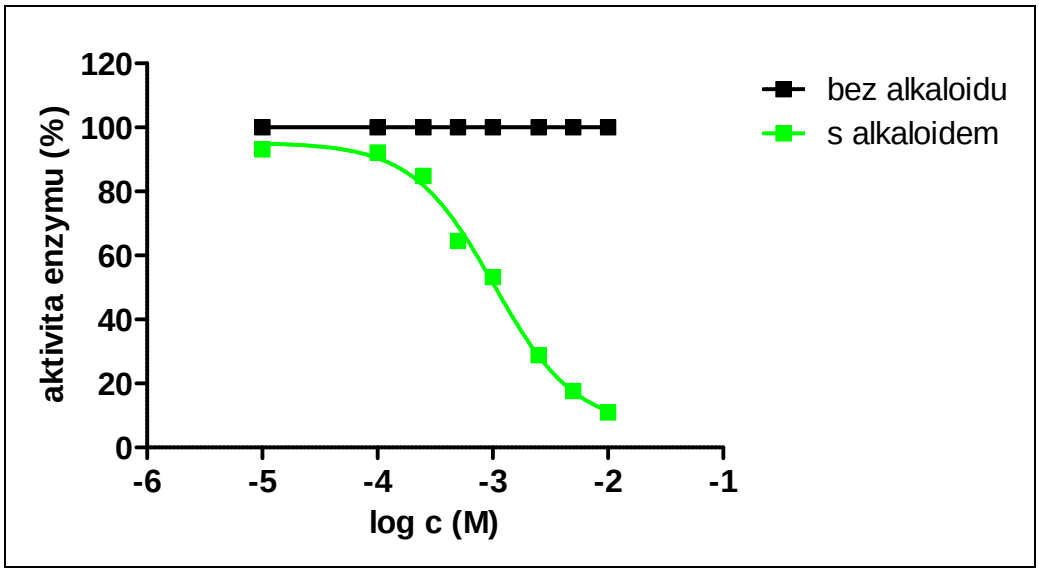
Obr. č. 23: Harman v DMSO/H_2O s ACHE



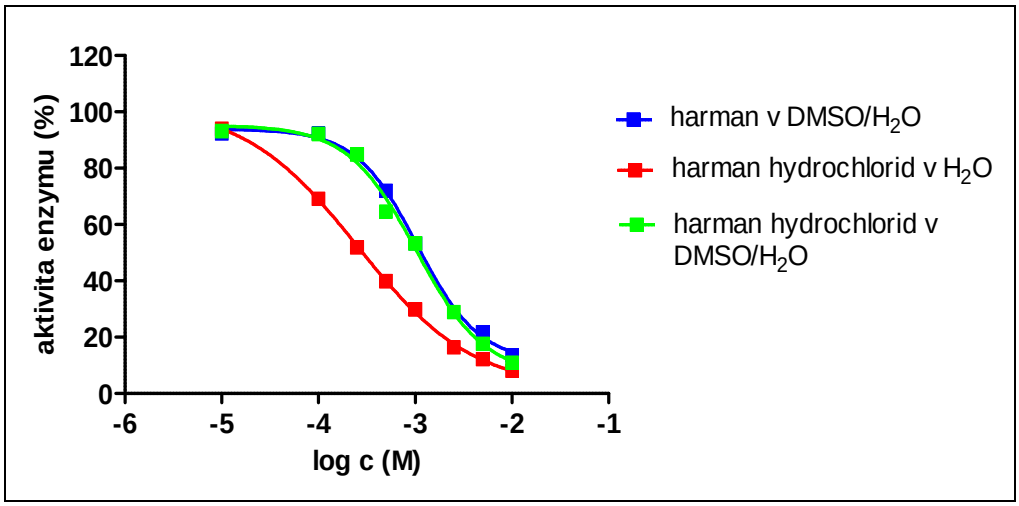
Obr. č. 24: Harman hydrochlorid v H_2O s ACHE



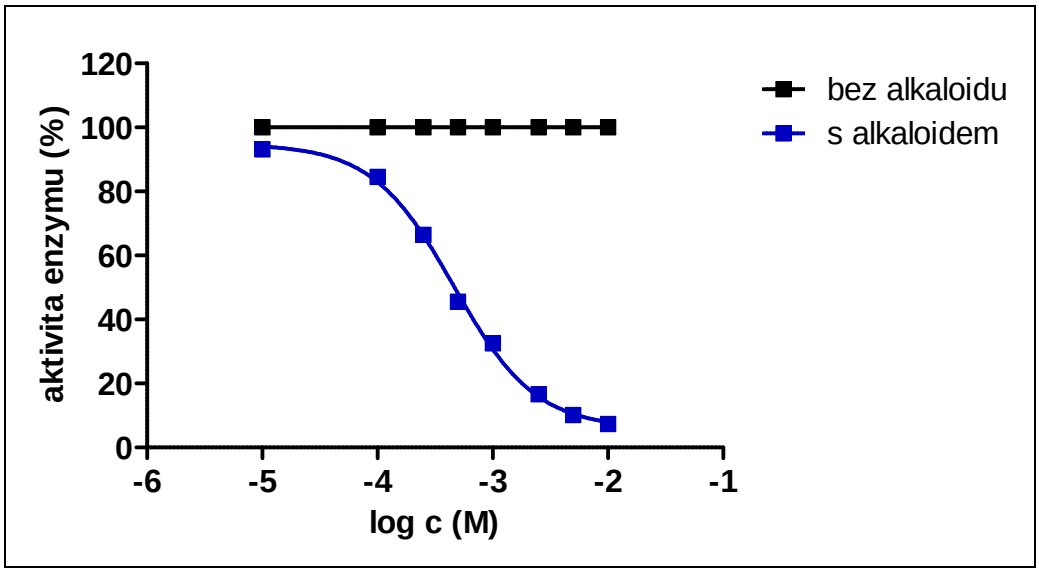
Obr. č. 25: Harman hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE



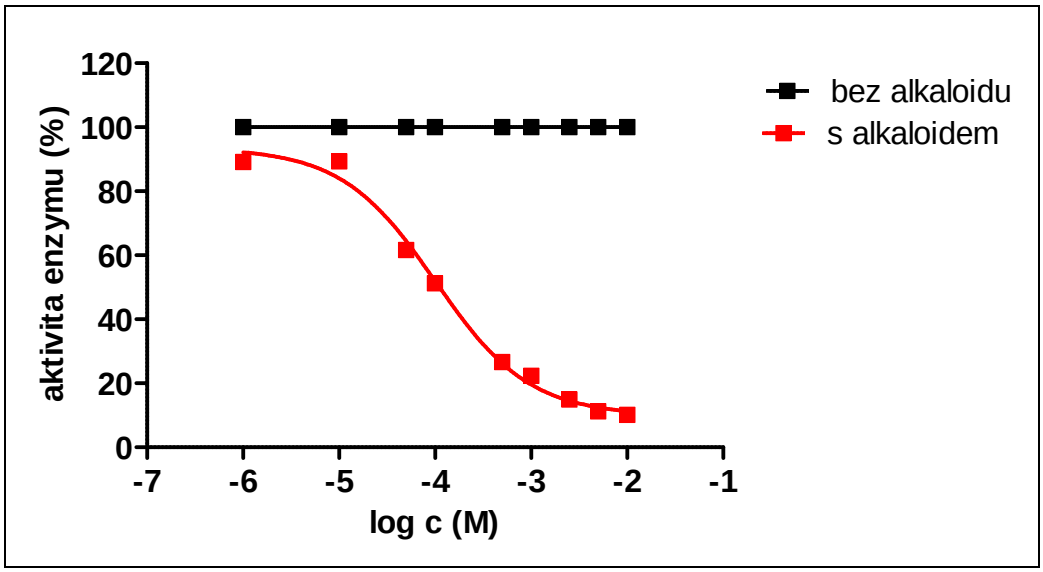
Obr. č. 26: Souhrn inhibiční aktivity harmanu s ACHE



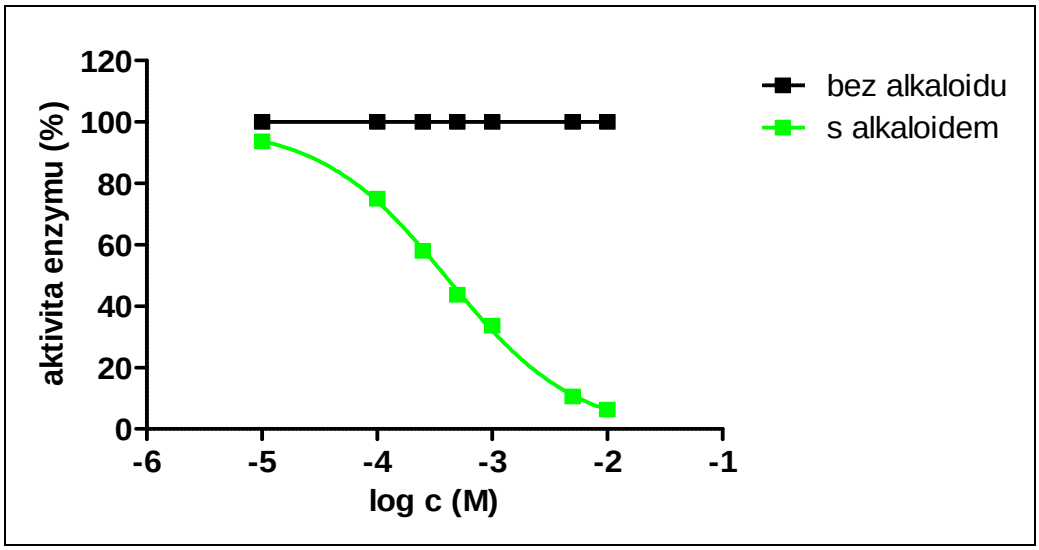
Obr. č. 27: Harmin v DMSO/H_2O s ACHE



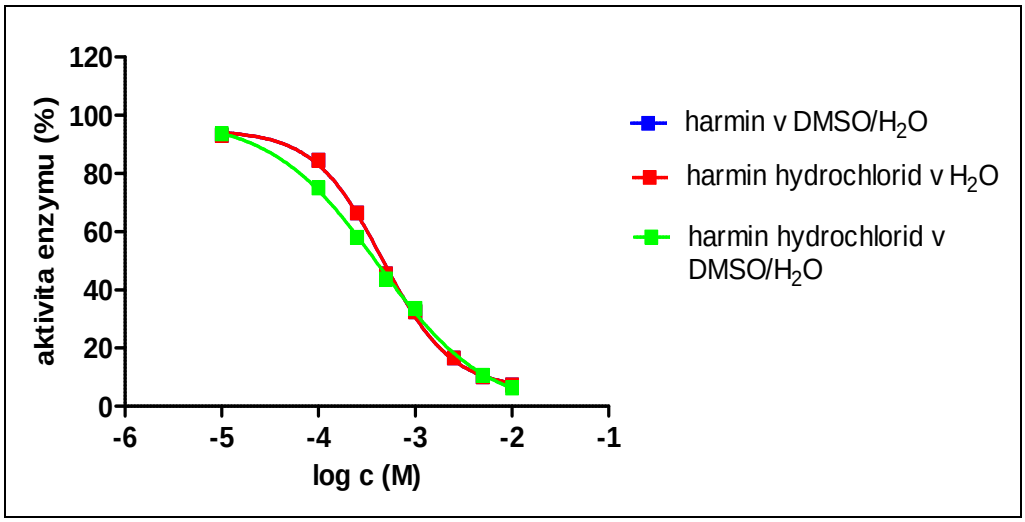
Obr. č. 28: Harmin hydrochlorid v H_2O s ACHE



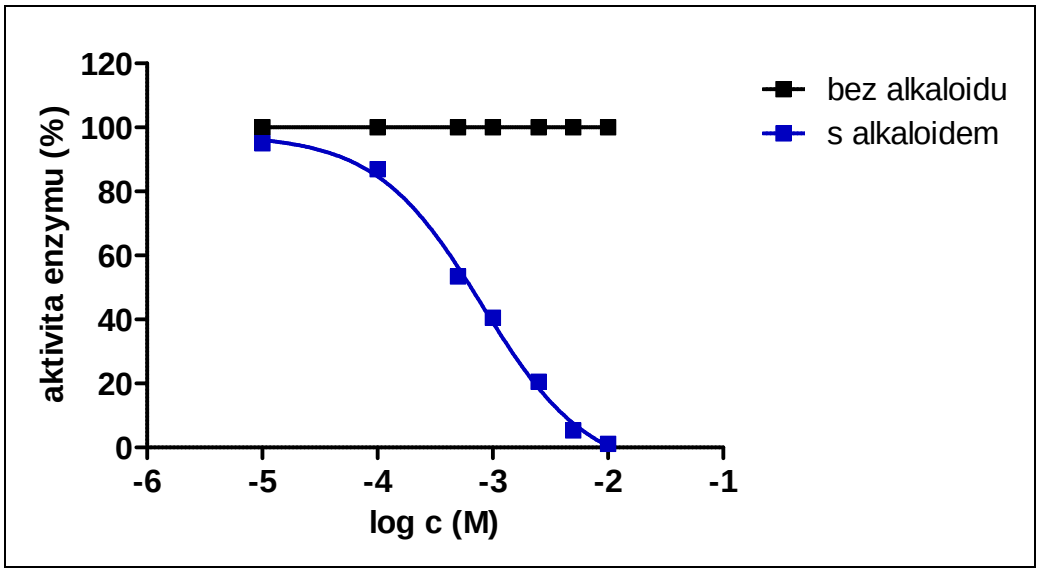
Obr. č. 29: Harmin hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE



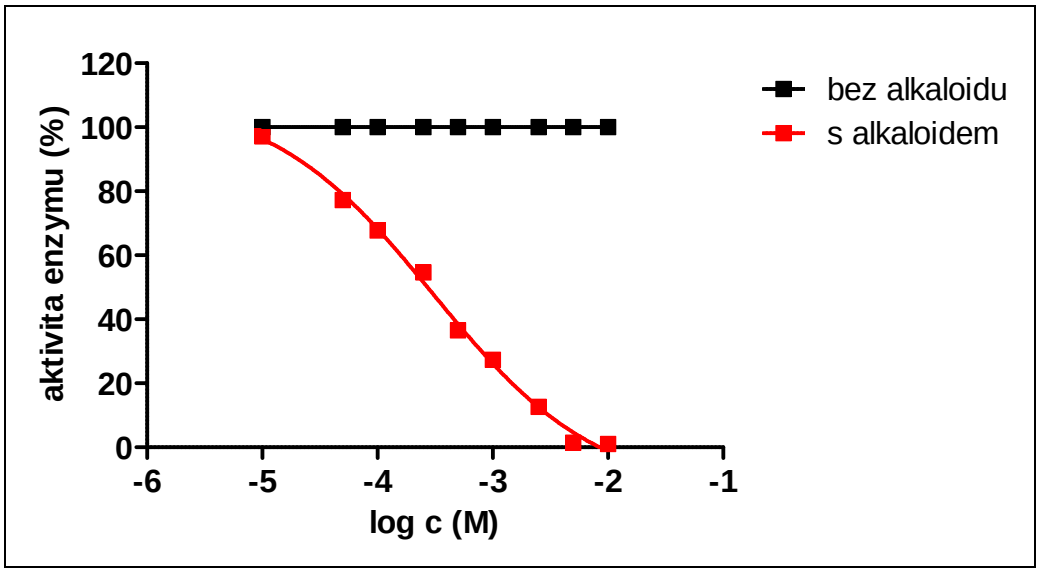
Obr. č. 30: Souhrn inhibiční aktivity harminu s ACHE



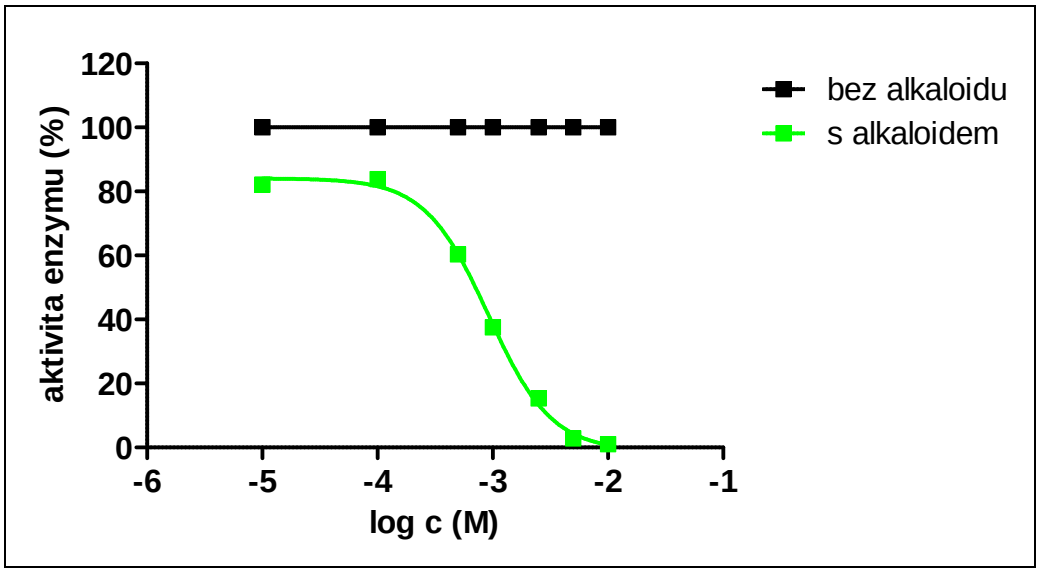
Obr. č. 31: Harmalin v DMSO/H_2O s ACHE



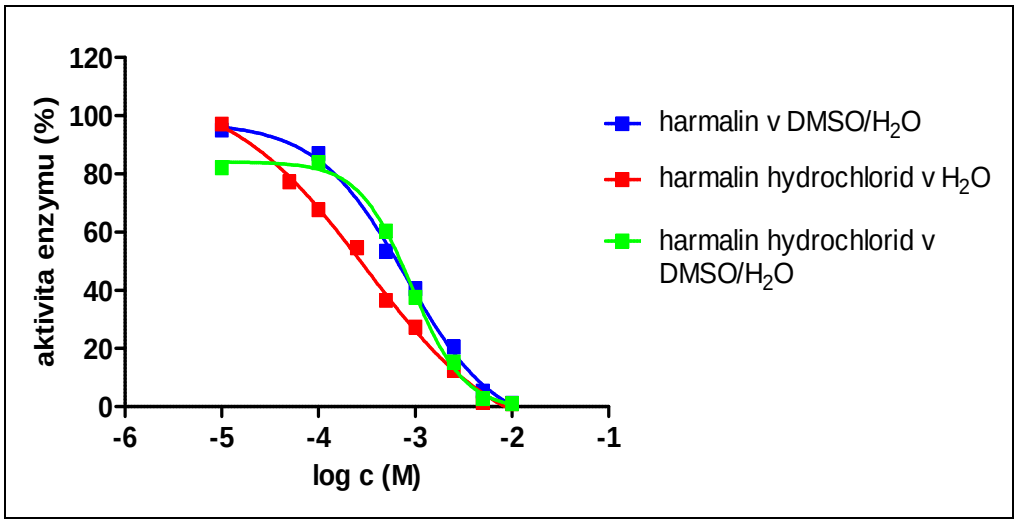
Obr. č. 32: Harmalin hydrochlorid v H_2O s ACHE



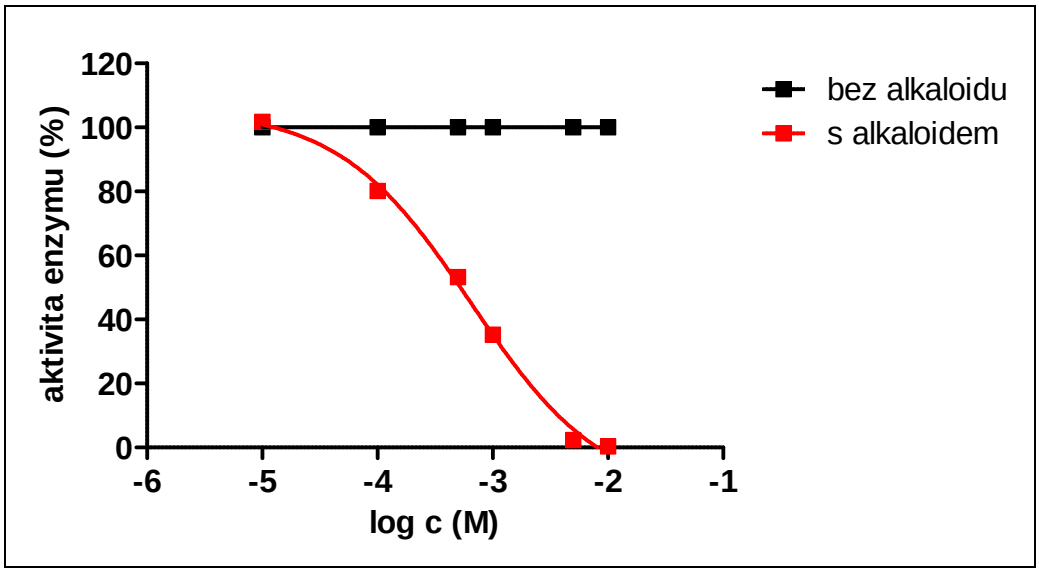
Obr. č. 33: Harmalin hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE



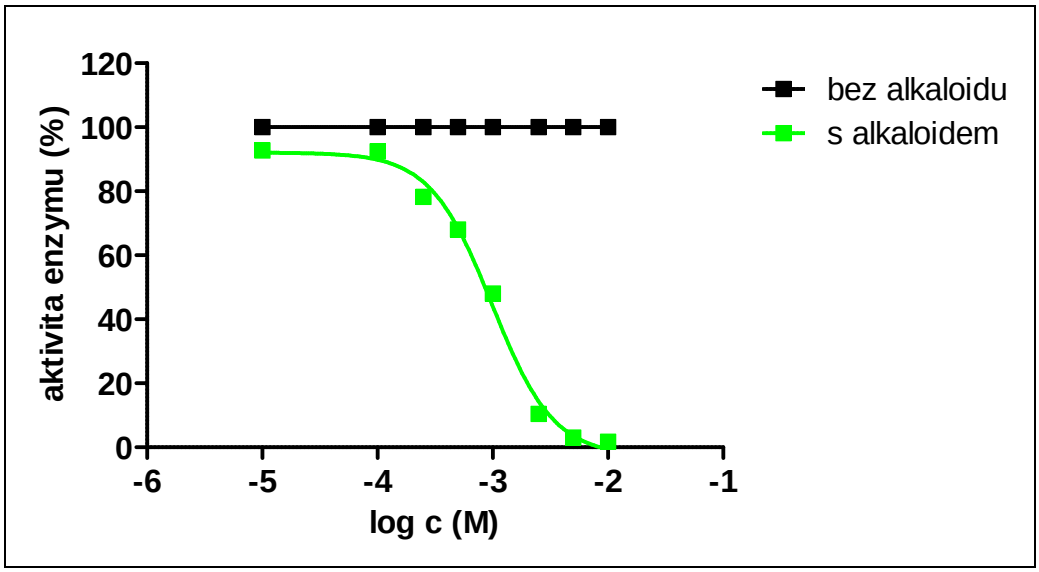
Obr. č. 34: Souhrn inhibiční aktivity harmalinu s ACHE



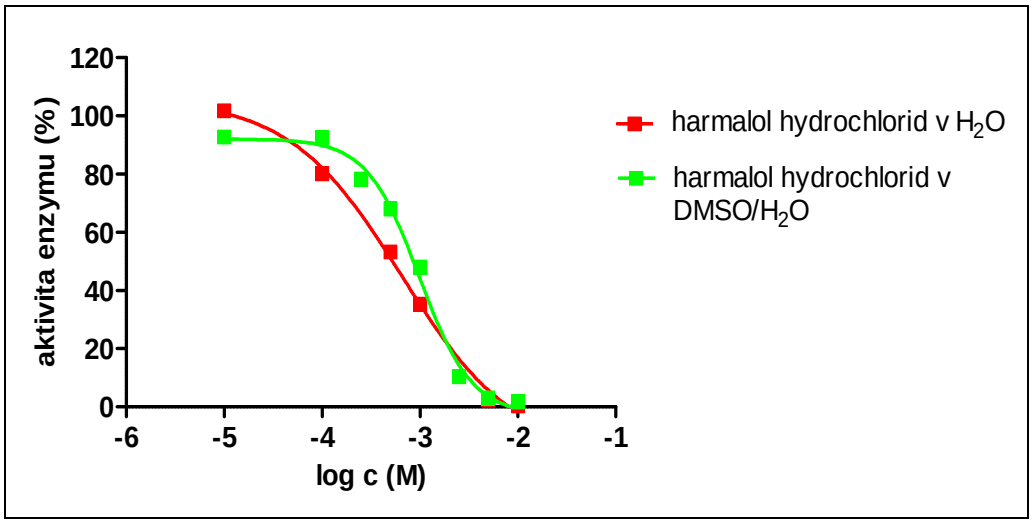
Obr. č. 35: Harmalol hydrochlorid v H_2O s ACHE



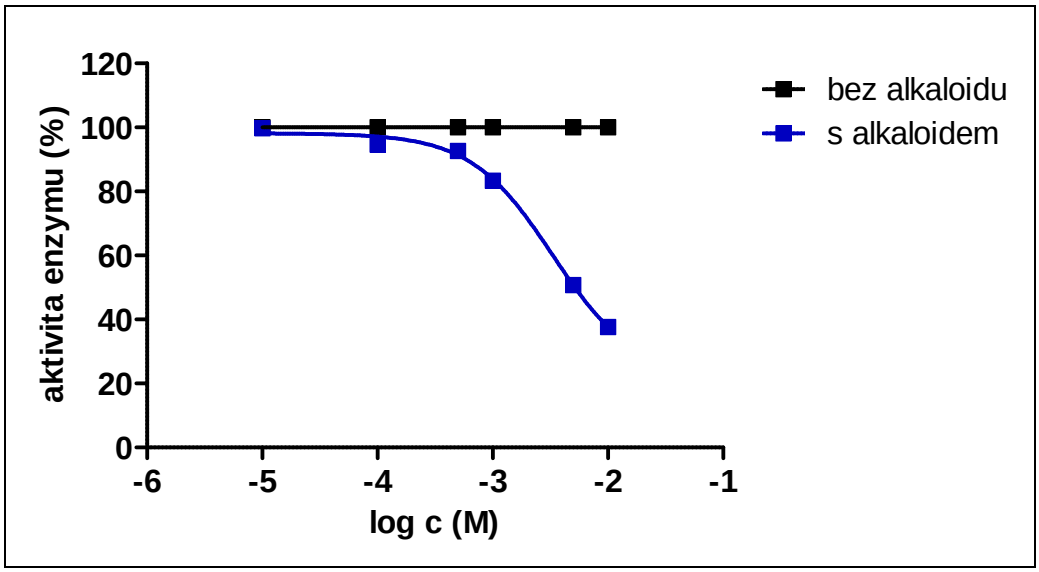
Obr. č. 36: Harmalol hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE



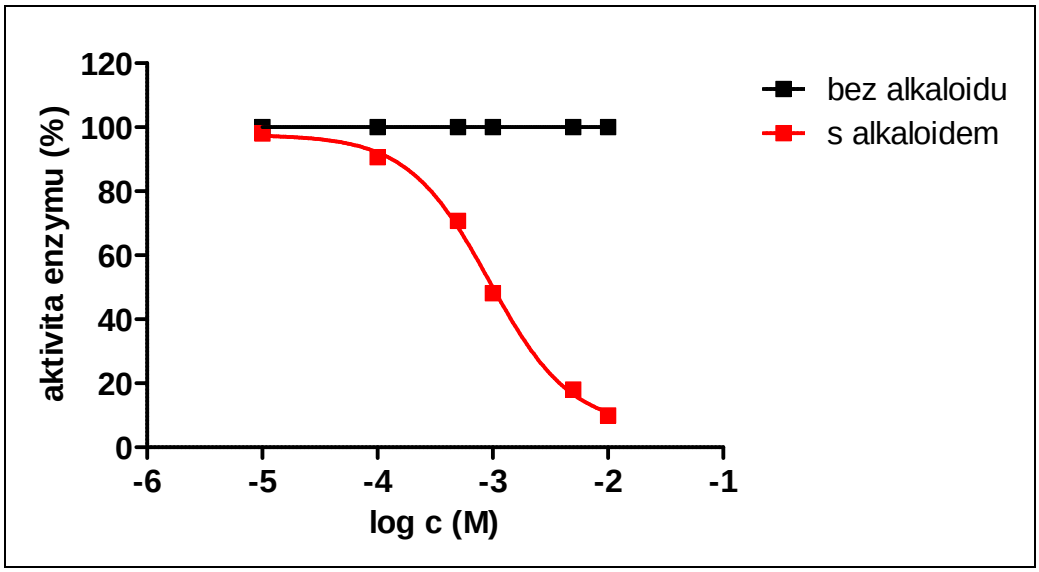
Obr. č. 37: Souhrn inhibiční aktivity harmalolu s ACHE



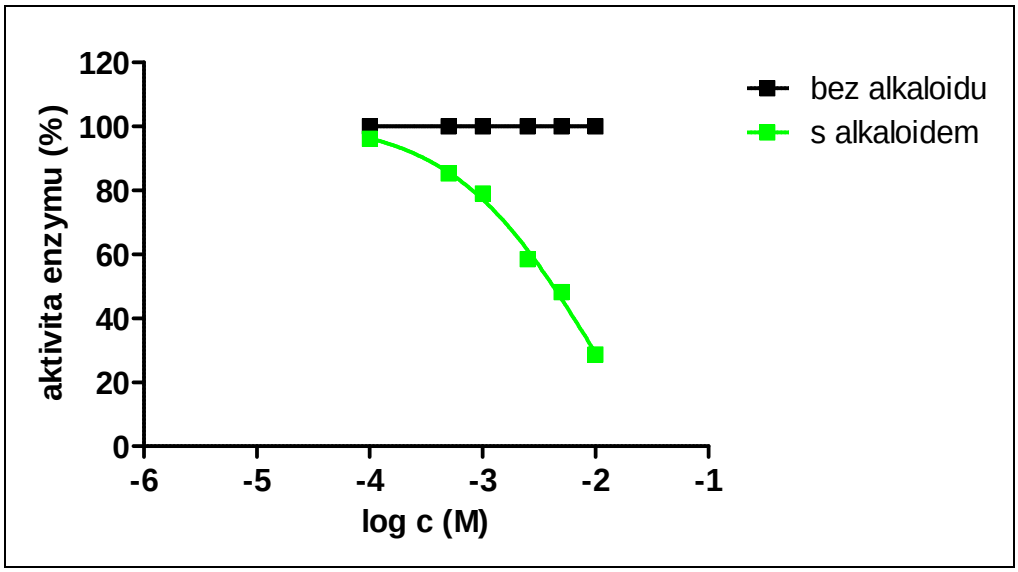
Obr. č. 38: Norharman v DMSO/H_2O s ACHE



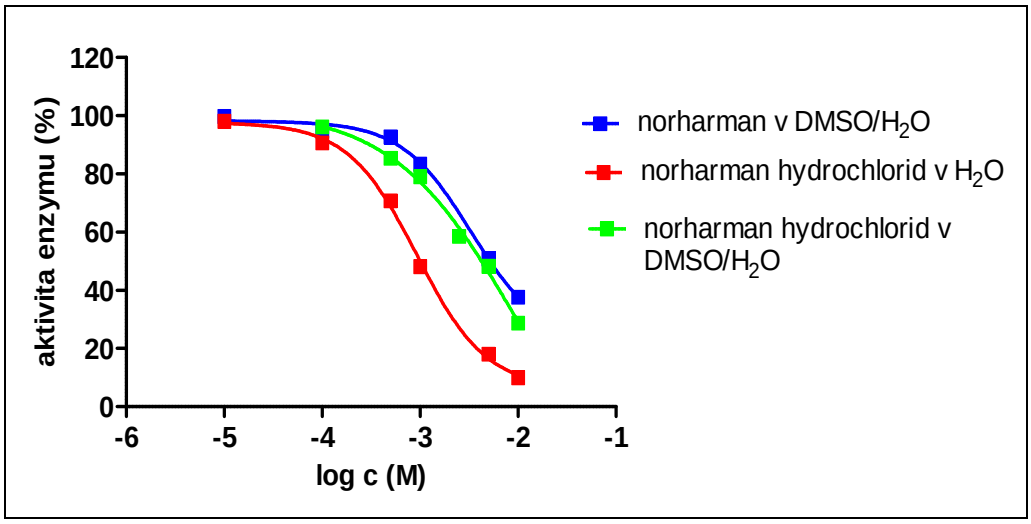
Obr. č. 39: Norharman hydrochlorid v H_2O s ACHE



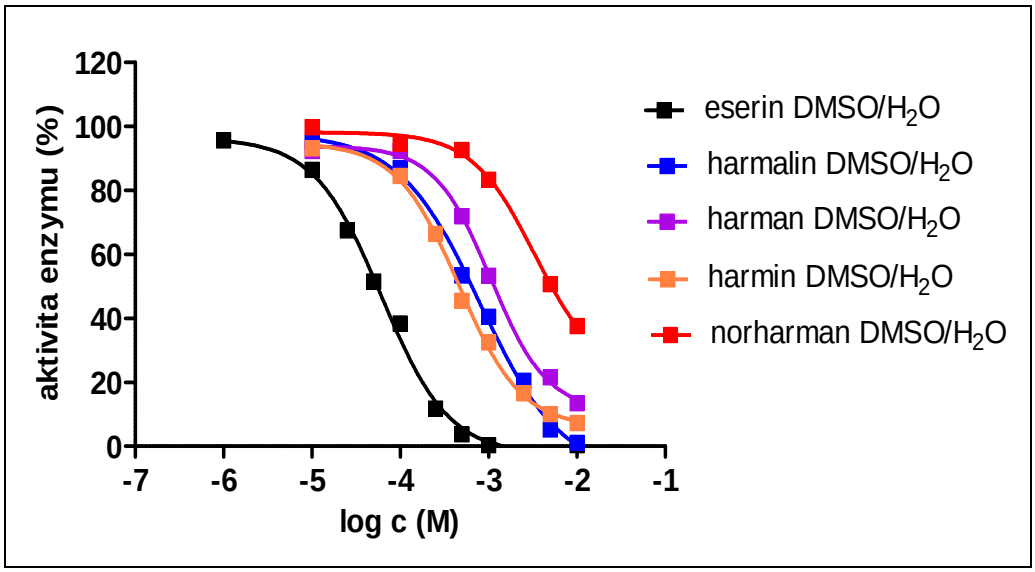
Obr. č. 40: Norharman hydrochlorid v DMSO/H_2O s ACHE



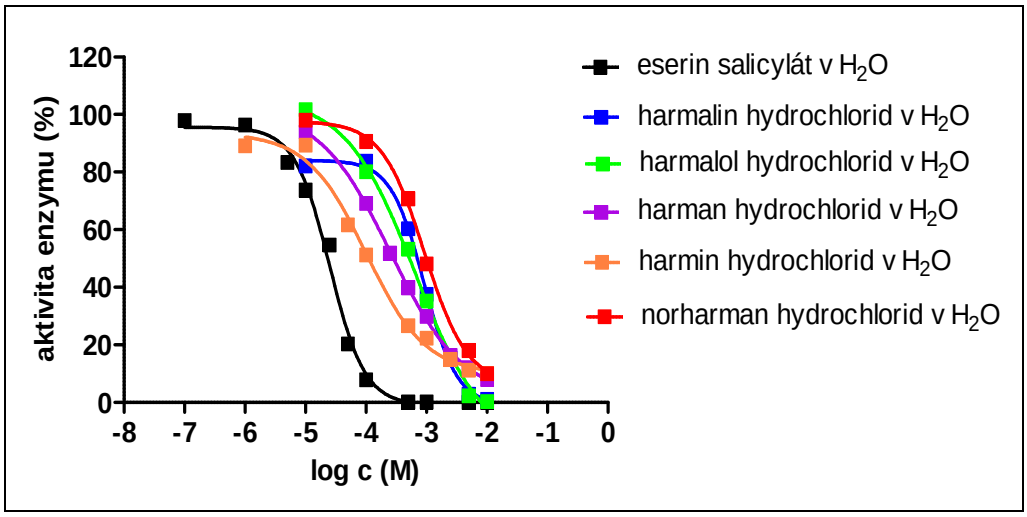
Obr. č. 41: Souhrn inhibiční aktivity norharmanu s ACHE



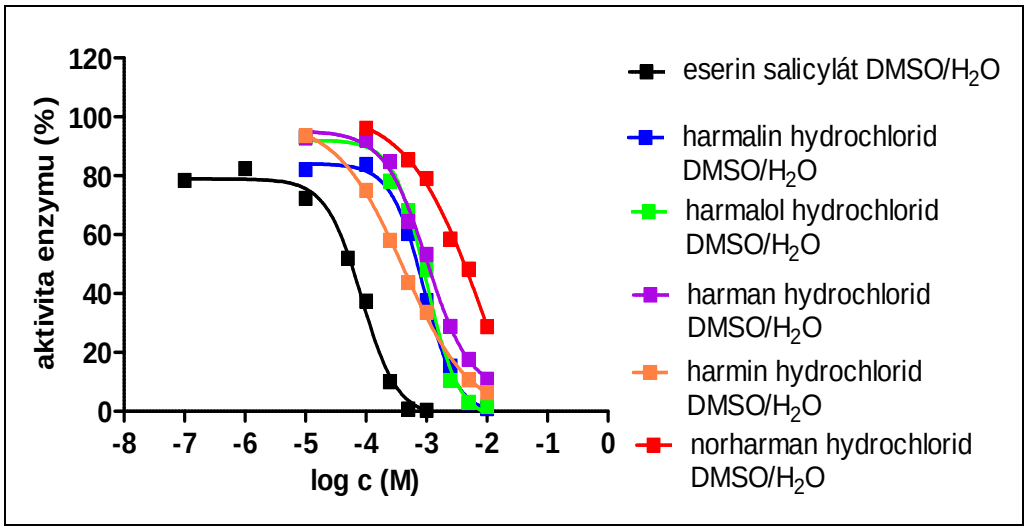
Obr. č. 42: Souhrn inhibiční aktivity alkaloidů v DMSO/H_2O s ACHE



Obr. č. 43: Souhrn inhibiční aktivity solí alkaloidů v H_2O s ACHE



Obr. č. 44: Souhrn inhibiční aktivity solí alkaloidů v DMSO/H_2O s ACHE



Tab. č. 26: Eserin v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2058	0,97	6,9044	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0013	7,69	0,0436	0,63
kontrola	0,2026		6,7970	98,45
kontrola 1´	0,2318	2,42	7,7767	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0044	8,05	0,1476	1,88
kontrola	0,3046		10,2190	131,41
kontrola 1´´	0,2219	8,23	7,4445	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0140	1,08	0,4700	6,29
kontrola	0,2241		7,5183	101,01
kontrola 2	0,2074	1,23	6,9581	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0539	1,86	1,8083	25,99
kontrola	0,2095		7,0285	101,04
kontrola 2´	0,2438	1,60	8,1792	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1133	0,66	3,8011	46,45
kontrola	0,2365		7,9343	97,01
kontrola 2´´	0,2315	0,17	7,7666	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1508	1,82	5,0912	65,12
kontrola	0,2318		7,7767	100,13
kontrola 3	0,2004	3,12	6,7232	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1846	0,79	6,1931	92,11
kontrola	0,2102		7,0520	104,92
kontrola 4	0,2376	5,83	7,9712	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2394	4,74	8,0316	100,76
kontrola	0,2767		9,2830	116,48
kontrola proti vodě	0,0010	5,26	1,7128	

Tab. č. 27: Eserin salicylát v H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2898	5,73	9,7225	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0002	50,00	0,0067	0,05
kontrola	0,2615		8,7730	90,23
kontrola 1´	0,2797	4,17	9,3836	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0002	50,00	0,0067	0,07
kontrola	0,2677		8,9812	95,73
kontrola 2	0,2941	2,09	9,8668	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0005	40,00	0,0168	0,17
kontrola	0,2827		9,4843	96,14
kontrola 2´	0,2437	2,54	8,1759	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0025	6,12	0,0839	1,01
kontrola	0,2374		7,9646	97,41
kontrola 2´´	0,2170	6,18	7,2801	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,0089	3,95	0,2986	4,08
kontrola	0,2284		7,6626	105,25
kontrola 3	0,2605	0,10	8,7395	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,0534	4,03	1,7915	20,48
kontrola	0,2643		8,8670	101,48
kontrola 3´	0,2622	2,21	8,7965	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,1042	3,65	3,4958	39,74
kontrola	0,2564		8,6020	97,79
kontrola 3´´	0,2789	0,20	9,3568	100,00
alkaloid 3´´: 2,5E-05 M	0,1855	1,24	6,2233	66,52
kontrola	0,2560		8,5885	91,81

kontrola 4	0,2528	2,51	8,4812	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2114	0,07	7,0923	83,62
kontrola	0,2438		8,1792	96,46
kontrola 4´	0,2252	4,04	7,5552	100,00
alkaloid 4´: 5E-06 M	0,2292	1,75	7,6894	92,49
kontrola	0,2478		8,3134	100,00
kontrola 5	0,2662	2,57	8,9307	100,00
alkaloid 5: 1E-06 M	0,2519	0,38	8,4510	94,63
kontrola	0,2619		8,7864	98,40
kontrola proti vodě	0,0003	60,00	0,0100	

Tab. č. 28: Eserin salicylát v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2562	1,27	8,5952	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0004	14,29	0,0134	0,14
kontrola	0,2533		8,4980	98,89
kontrola 1´	0,2271	1,54	7,6190	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0049	11,34	0,1643	2,14
kontrola	0,2263		7,5921	99,65
kontrola 1´´	0,2379	0,13	7,8270	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0192	2,60	0,6441	8,07
kontrola	0,2333		7,8270	98,07
kontrola 2	0,2631	1,62	8,8267	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0536	0,47	1,7982	20,36
kontrola	0,2495		8,3704	94,85
kontrola 2´	0,2452	1,26	8,2262	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1204	3,32	4,0393	49,10
kontrola	0,2452		8,2262	100,00
kontrola 2´´	0,2243	3,48	7,5250	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1657	2,26	5,5591	73,85
kontrola	0,2195		7,3640	97,86
kontrola 3	0,2468	0,06	8,2799	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1977	0,28	6,6326	80,10
kontrola	0,2293		7,6928	92,93
kontrola 4	0,2435	0,86	8,1692	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2368	0,95	7,9444	97,23
kontrola	0,2376		7,9712	97,58
kontrola proti vodě	0,0005	80,00	0,0168	

Tab. č. 29: Harman DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2029	1,28	6,8071	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0022	16,28	0,0738	1,06
kontrola	0,2052		6,8842	101,13
kontrola 1´	0,2010	4,38	6,7433	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0054	10,28	0,1811	2,66
kontrola	0,1839		6,1697	91,49
kontrola 2	0,2211	2,69	7,4177	100,00
alkaloid 2: 1E-03	0,0638	2,35	2,1404	28,86
kontrola	0,2129		7,1426	96,31
kontrola 2´	0,1900	2,47	6,3743	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1046	5,45	3,5092	55,05
kontrola	0,2083		6,9882	109,63
kontrola 3	0,2022	0,96	6,7836	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1851	1,51	6,2100	91,57
kontrola	0,2116		7,0990	104,67
kontrola 4	0,2078	1,42	6,9714	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2173	3,01	7,2902	104,57
kontrola	0,2239		7,5116	107,77
kontrola proti vodě	0,0008	20,00	0,0268	

Tab. č. 30: Harman hydrochlorid H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2692	4,63	9,0314	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0036	7,04	0,1208	1,32
kontrola	0,1927		6,4649	71,60
kontrola 1´´	0,3381	0,49	11,1356	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0275	2,37	0,9226	8,12
kontrola	0,2628		8,8167	77,74
kontrola 2	0,2437	4,86	8,1759	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0532	0,56	1,7848	21,83
kontrola	0,2432		8,1591	99,82
kontrola 2´	0,3188	2,31	10,6954	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1032	4,55	3,4623	32,38
kontrola	0,3195		10,7190	100,24
kontrola 2´´	0,2756	1,98	9,2461	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1370	1,02	4,5962	49,72
kontrola	0,2783		9,3367	101,00
kontrola 3	0,2671	0,36	8,9609	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1850	1,22	6,2066	69,26
kontrola	0,2689		9,0213	100,69
kontrola 3´	0,2999	2,03	10,0613	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,2412	0,27	8,0920	80,41
kontrola	0,3155		10,5847	105,20
kontrola 4	0,2474	3,07	8,3000	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2386	0,04	8,0048	96,44
kontrola	0,2473		8,2967	99,96
kontrola proti vodě	0,0003	33,33	0,0100	

Tab. č. 31: Harman hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2704	2,61	9,0716	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0022	6,98	0,0738	0,80
kontrola	0,2385		8,0014	88,22
kontrola 1´´	0,2665	4,05	8,9408	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0212	2,13	0,7112	7,94
kontrola	0,2763		9,2696	103,68
kontrola 2	0,2517	1,17	8,4443	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0474	28,19	1,5902	18,82
kontrola	0,2415		8,1021	95,97
kontrola 2´	0,2758	4,33	9,2528	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1322	5,37	4,4352	47,94
kontrola	0,2501		8,3906	90,70
kontrola 2´´	0,2729	2,09	9,1555	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1904	1,02	6,3877	69,75
kontrola	0,2652		8,8972	97,18
kontrola 3	0,2442	3,38	8,1927	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2197	2,05	7,3707	89,99
kontrola	0,2468		8,2799	101,09
kontrola 4	0,2461	2,26	8,2564	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2527	2,36	8,4778	102,68
kontrola	0,2553		8,5651	103,76
kontrola proti vodě	0,0002	50,00	0,0067	

Tab. č. 32: Harmin v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1829	6,26	6,1361	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0010	0	0,0335	0,55
kontrola	0,1803		6,0489	98,61
kontrola 1´	0,1954	3,63	6,5554	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0022	16,28	0,0738	1,10
kontrola	0,1679		5,6329	85,93
kontrola 2	0,1938	2,01	6,5018	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0258	1,16	0,8656	13,31
kontrola	0,2105		7,0621	108,62
kontrola 2´	0,1974	0,71	6,6226	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0565	12,04	1,8956	28,62
kontrola	0,2016		6,7635	102,13
kontrola 2´´	0,2425	0,45	8,1356	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1344	0,48	4,5090	55,40
kontrola	0,2383		7,9947	98,27
kontrola 3	0,1998	0,85	6,7031	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1639	0,88	5,4987	82,01
kontrola	0,1879		6,3031	94,04
kontrola 4	0,1983	0	6,6528	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,1991	4,62	6,6796	100,40
kontrola	0,2075		6,9614	104,64
kontrola proti vodě	0,0060	5,00	0,2013	

Tab. č. 33: Harmin hydrochlorid v H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,3225	0,76	10,8196	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0217	16,13	0,7280	6,73
kontrola	0,2469		8,2832	76,57
kontrola 1´´	0,3095	3,31	10,3834	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0256	2,34	0,8589	8,27
kontrola	0,2916		9,7829	94,23
kontrola 2	0,2878	2,62	9,6554	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0633	3,00	2,1237	22,00
kontrola	0,3129		10,4975	108,74
kontrola 2´	0,3098	1,73	10,3935	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1144	0,48	3,8380	36,92
kontrola	0,2916		9,7929	94,14
kontrola 2´´	0,3161	1,22	10,6048	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1810	2,63	6,0724	57,25
kontrola	0,2985		10,0144	94,45
kontrola 3	0,3061	0,42	10,2693	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2527	5,17	8,4778	82,54
kontrola	0,3239		10,8665	105,82
kontrola 4	0,2408	3,30	8,0786	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2569	1,62	8,6187	106,68
kontrola	0,2432		8,1591	100,98
kontrola proti vodě	0,0290	32,41	0,9729	

Tab. č. 34: Harmin hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2854	0,98	9,5749	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0017	9,09	0,0570	0,58
kontrola	0,2416		8,1054	84,65
kontrola 1´´	0,3049	0,92	10,2291	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0088	4,00	0,2952	2,87
kontrola	0,2953		9,9070	96,85
kontrola 2	0,2456	1,20	8,2396	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0283	3,18	0,9494	11,53
kontrola	0,2685		9,0079	109,35
kontrola 2´	0,2501	1,58	8,3906	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0749	0,80	2,5128	29,95
kontrola	0,2691		9,0280	107,62
kontrola 2´´	0,2647	2,36	8,8804	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1583	3,25	5,3108	59,80
kontrola	0,2854		9,5749	107,84
kontrola 3	0,2736	1,19	9,1790	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2106	2,92	7,0654	76,97
kontrola	0,2680		8,9911	97,97
kontrola 4	0,2638	2,77	8,8502	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2348	1,09	7,8773	88,99
kontrola	0,2427		8,1423	92,00
kontrola proti vodě	0,0015	0	0,0503	

Tab. č. 35: Harmalin v DMSO/H_2O BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2042	0,78	6,8507	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0023	46,67	0,0772	1,10
kontrola	0,2062		6,9178	100,98
kontrola 1´	0,2010	5,42	6,7433	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0041	14,63	0,1376	2,04
kontrola	0,1913		6,4179	95,17
kontrola 1´´	0,1985	2,22	6,6595	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0395	5,70	1,3252	19,87
kontrola	0,1963		6,5119	98,89
kontrola 2	0,2144	2,10	7,1929	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,1231	1,99	4,1300	57,39
kontrola	0,1941		6,5119	90,53
kontrola 2´	0,2025	8,22	6,7937	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1511	1,46	5,0693	74,64
kontrola	0,1902		6,3810	93,95
kontrola 3	0,2024	0,15	6,7903	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1956	0,20	6,5622	96,64
kontrola	0,1961		6,5790	96,89
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 36: Harmalin hydrochlorid v H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2318	0,39	7,7767	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0012	82,61	0,0403	0,50
kontrola	0,1974		6,6223	85,16
kontrola 1´	0,2225	1,06	7,4647	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0039	25,64	0,1308	1,75
kontrola	0,2353		7,8941	105,78
kontrola 1´´	0,2234	0,31	7,4948	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0435	0,16	1,4594	19,47
kontrola	0,2290		7,6827	102,51
kontrola 2	0,2314	2,05	7,7632	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,1352	2,51	4,5358	58,44
kontrola	0,2460		8,2531	106,33
kontrola 2´	0,2291	1,46	7,6861	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1674	0,93	5,6161	73,06
kontrola	0,2260		7,5821	98,67
kontrola 3	0,2267	1,30	7,6056	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2155	0,72	7,2298	95,06
kontrola	0,2347		7,8740	103,55
kontrola 4	0,2669	1,16	8,9542	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2442	0,84	8,1927	91,48
kontrola	0,2343		7,8605	87,79
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 37: Harmalin hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2539	0,18	8,5181	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0042	9,52	0,1409	1,65
kontrola	0,2623		8,8000	103,33
kontrola 1´	0,2632	1,03	8,8301	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0046	19,57	0,1543	1,75
kontrola	0,2611		8,7596	99,20
kontrola 1´´	0,2442	2,38	8,1927	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0329	3,04	1,1038	13,47
kontrola	0,2295		7,6995	93,98
kontrola 2	0,2420	0,39	8,1189	100,00
alkaloid 2: 1E-03	0,1181	1,23	3,9621	48,79
kontrola	0,2374		7,9645	98,12
kontrola 2´	0,2321	0,80	7,7867	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1721	2,67	5,7738	74,17
kontrola	0,2333		7,8270	100,54
kontrola 3	0,2501	2,94	8,3906	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2494	5,81	8,3671	99,73
kontrola	0,2505		8,4040	100,00
kontrola proti vodě	0,0090	33,33	0,3019	

Tab. č. 38: Harmalol hydrochlorid v H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (%)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2479	5,14	8,3168	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0014	92,59	0,0470	0,54
kontrola	0,1880		6,3072	75,85
kontrola 1´	0,2164	2,20	7,2600	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0010	47,37	0,0333	0,44
kontrola	0,2005		6,7266	92,67
kontrola 2	0,2327	2,08	7,8069	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0314	0,32	1,0534	13,50
kontrola	0,2310		7,7498	99,29
kontrola 2´	0,2370	5,25	7,9511	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0451	0,33	1,5130	19,01
kontrola	0,2459		8,2497	103,78
kontrola 3	0,3125	0,35	10,4841	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1353	0,81	4,5392	43,30
kontrola	0,2786		9,3468	89,15
kontrola 3´	0,2766	2,53	9,2797	100,00
alkaloid 3´: 5E-05 M	0,1495	0,27	5,0156	54,05
kontrola	0,2483		8,3302	89,77
kontrola 4	0,2905	1,39	9,7460	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2506	3,15	8,4074	86,28
kontrola	0,2557		8,5785	88,04
kontrola 5	0,2537	0,65	8,5114	100,00
alkaloid 5: 1E-06 M	0,2504	1,64	8,4007	98,72
kontrola	0,2553		8,5651	100,65
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 39: Harmalol hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2213	2,08	7,4244	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0013	44,00	0,0436	0,56
kontrola	0,2209		7,4110	99,82
kontrola 1´	0,2350	2,30	7,8840	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0022	6,98	0,0738	0,91
kontrola	0,2078		6,9715	88,43
kontrola 1´´	0,2249	6,36	7,5452	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0091	14,29	0,3053	4,05
kontrola	0,2290		7,6827	101,82
kontrola 2	0,2146	3,12	7,1996	100,00
alkaloid 2: 1E-03	0,0796	3,96	2,6705	37,07
kontrola	0,2280		7,6492	106,24
kontrola 2´	0,2290	0,90	7,6827	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1127	0,31	3,7810	49,20
kontrola	0,2380		7,9847	103,95
kontrola 2´´	0,2186	6,72	7,3338	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1487	3,23	4,9887	68,02
kontrola	0,2135		7,1627	97,67
kontrola 3	0,2206	1,02	7,4009	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1876	2,16	6,2938	85,04
kontrola	0,2255		7,5653	102,24
kontrola 4	0,2372	3,01	7,9578	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2199	1,11	7,3774	92,71
kontrola	0,2190		7,3472	92,35
kontrola proti vodě	0	0	0	

Tab. č. 40: Norharman v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,1964	1,53	6,5890	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0021	7,32	0,0705	1,04
kontrola	0,1924		6,4548	97,96
kontrola 1´	0,1978	1,37	6,6360	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0086	1,75	0,2885	4,32
kontrola	0,1994		6,6897	100,81
kontrola 1´´	0,2042	1,98	6,8507	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0287	0,52	0,9629	14,03
kontrola	0,2119		7,1090	103,80
kontrola 2	0,2391	0,90	8,0216	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0958	0,47	3,2140	40,05
kontrola	0,2218		7,4412	92,78
kontrola 2´	0,2228	0,04	7,4747	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1453	3,10	4,8747	65,22
kontrola	0,2257		7,5720	101,30
kontrola 2´´	0,2324	0,19	7,7968	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1921	0,81	6,4448	82,66
kontrola	0,2426		8,1390	104,41
kontrola 3	0,2214	4,09	7,4277	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2076	2,70	6,9648	93,79
kontrola	0,2242		7,5217	101,29
kontrola 4	0,2219	0,79	7,4445	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2112	2,84	7,0855	95,20
kontrola	0,2236		7,5016	100,79
kontrola proti vodě	0,0023	15,56	0,0772	

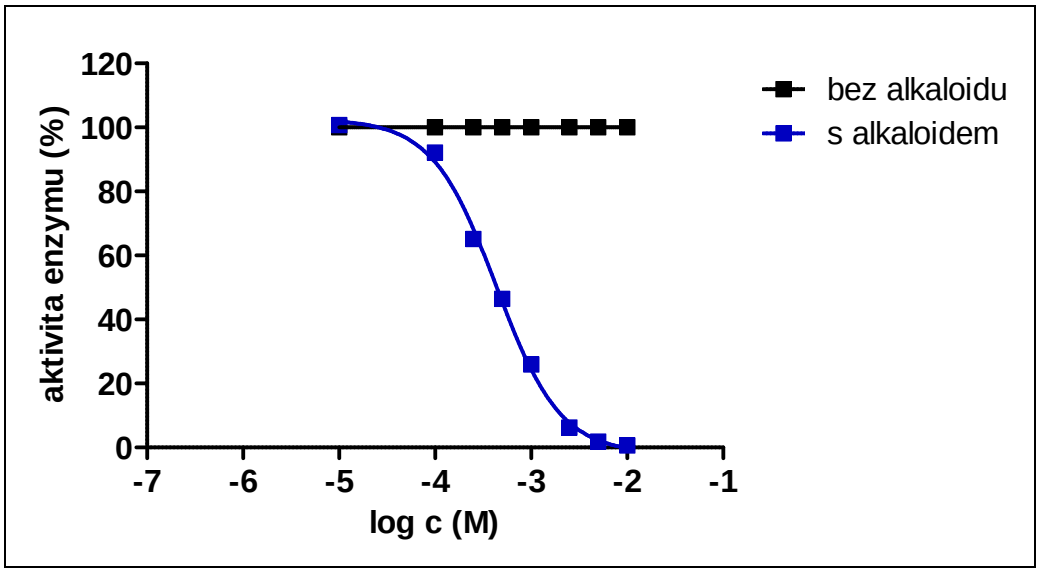
Tab. č. 41: Norharman hydrochlorid v H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2391	1,99	8,0216	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0009	64,71	0,0302	0,36
kontrola	0,1952		6,5488	81,66
kontrola 1´	0,2205	3,04	7,3976	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0032	3,13	0,1074	1,45
kontrola	0,2164		7,2600	98,14
kontrola 2	0,2566	0,14	8,6087	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0412	3,03	1,3822	16,06
kontrola	0,1916		6,4280	74,68
kontrola 2´	0,2631	0,68	8,8267	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,0694	4,18	2,3283	26,38
kontrola	0,2362		7,9243	89,78
kontrola 2´´	0,2463	0,04	8,2631	100,00
alkaloid 2´´: 2,5E-04 M	0,1073	1,40	3,5998	43,56
kontrola	0,2620		8,7898	106,37
kontrola 3	0,2638	1,33	8,8502	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,1626	0,34	5,4551	61,62
kontrola	0,2537		8,5114	96,17
kontrola 4	0,2702	1,57	9,0649	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2257	2,50	7,5720	83,53
kontrola	0,2359		7,9142	87,32
kontrola 5	0,2370	2,34	7,9511	100,00
alkaloid 5: 1E-06 M	0,2309	0,22	7,7464	97,45
kontrola	0,2357		7,9095	99,47
kontrola proti vodě	0,0004	50,00	0,0134	

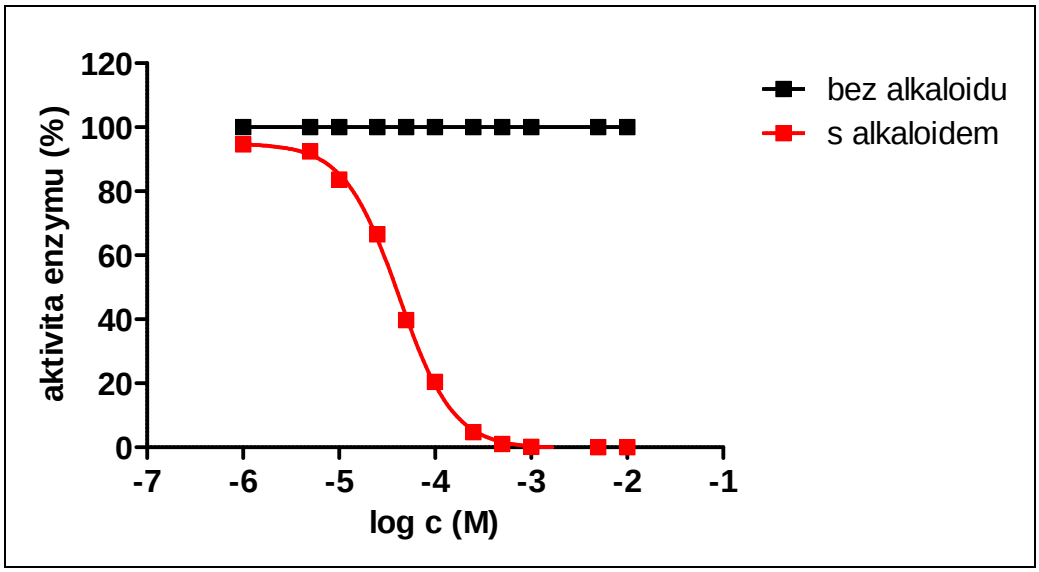
Tab. č. 42: Norharman hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE

vzorky	ΔA/min (min^{-1})	smodch (%)	specifická aktivita (U/mg)	aktivita (%)
kontrola 1	0,2288	7,74	7,6760	100,00
alkaloid 1: 1E-02 M	0,0020	5,00	0,0671	0,87
kontrola	0,2178		7,3707	95,19
kontrola 1´	0,2619	2,37	8,7865	100,00
alkaloid 1´: 5E-03 M	0,0101	0,49	0,3388	3,88
kontrola	0,2724		9,1387	104,01
kontrola 1´´	0,2799	2,47	9,3903	100,00
alkaloid 1´´: 2,5E-03 M	0,0316	1,90	1,0601	11,29
kontrola	0,2637		8,8469	94,21
kontrola 2	0,2243	4,17	7,5250	100,00
alkaloid 2: 1E-03 M	0,0915	1,47	3,0697	40,81
kontrola	0,2286		7,6693	101,89
kontrola 2´	0,2747	1,77	9,2159	100,00
alkaloid 2´: 5E-04 M	0,1740	2,30	5,8375	63,33
kontrola	0,2800		9,3937	101,91
kontrola 3	0,2787	4,93	9,3501	100,00
alkaloid 3: 1E-04 M	0,2456	0,24	8,2396	88,11
kontrola	0,2578		8,6489	92,48
kontrola 4	0,2491	0,02	8,3571	100,00
alkaloid 4: 1E-05 M	0,2449	2,92	8,2162	98,31
kontrola	0,2544		8,5349	102,11
kontrola proti vodě	0,0011	18,18	0,0369	

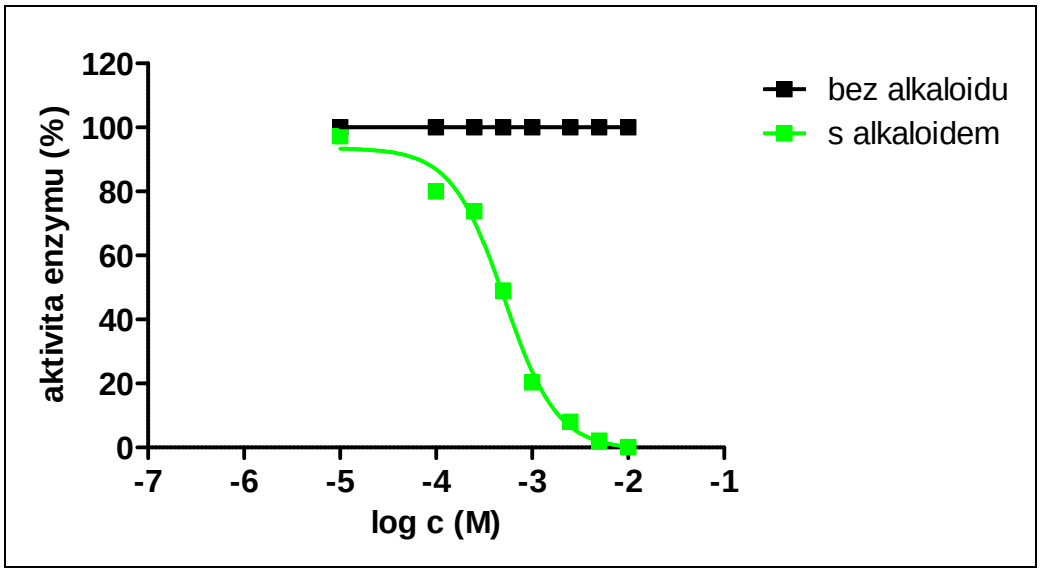
Obr. č. 45: Eserin v DMSO/H_2O s BUCHE



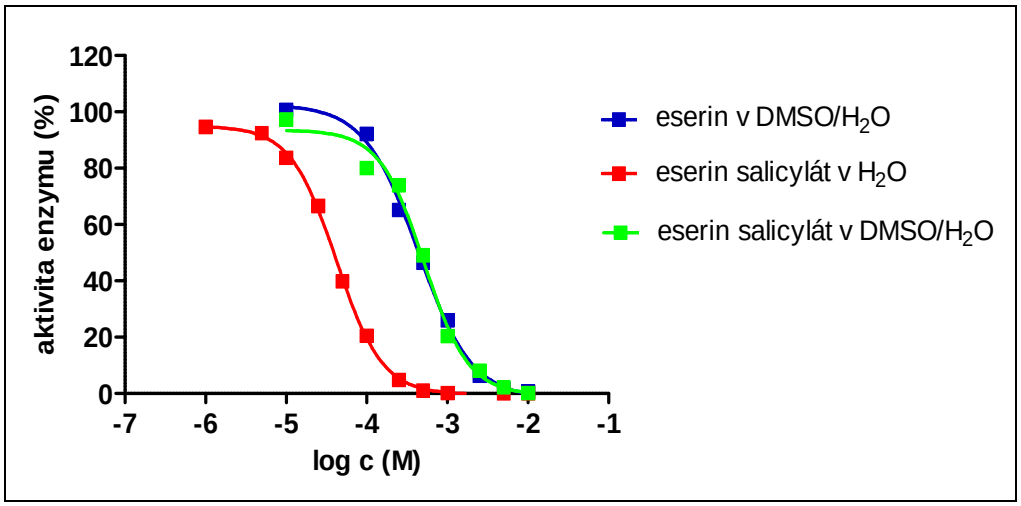
Obr. č. 46: Eserin salicylát v H_2O s BUCHE



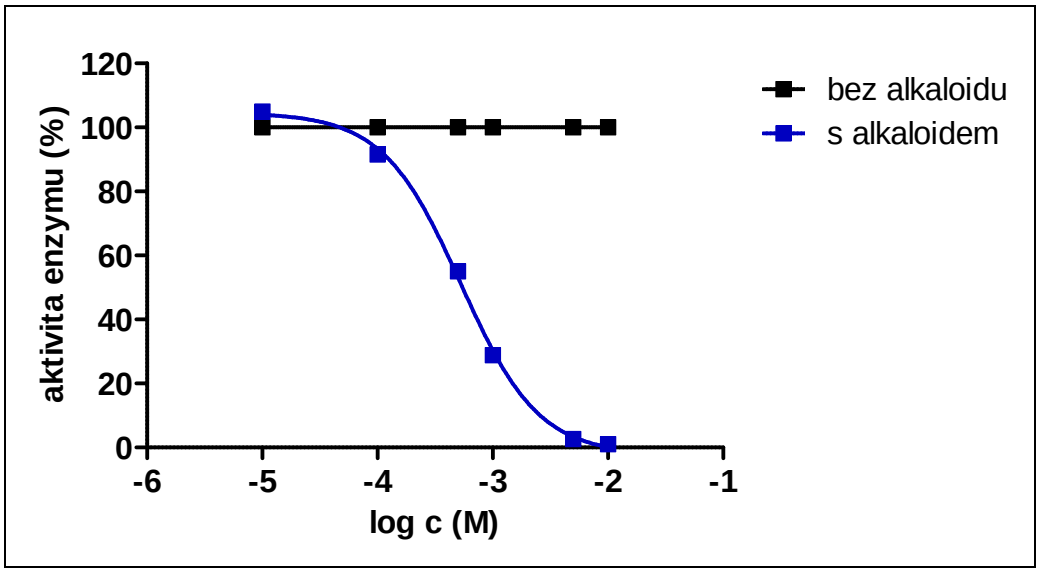
Obr. č. 47: Eserin salicylát v DMSO/H_2O s BUCHE



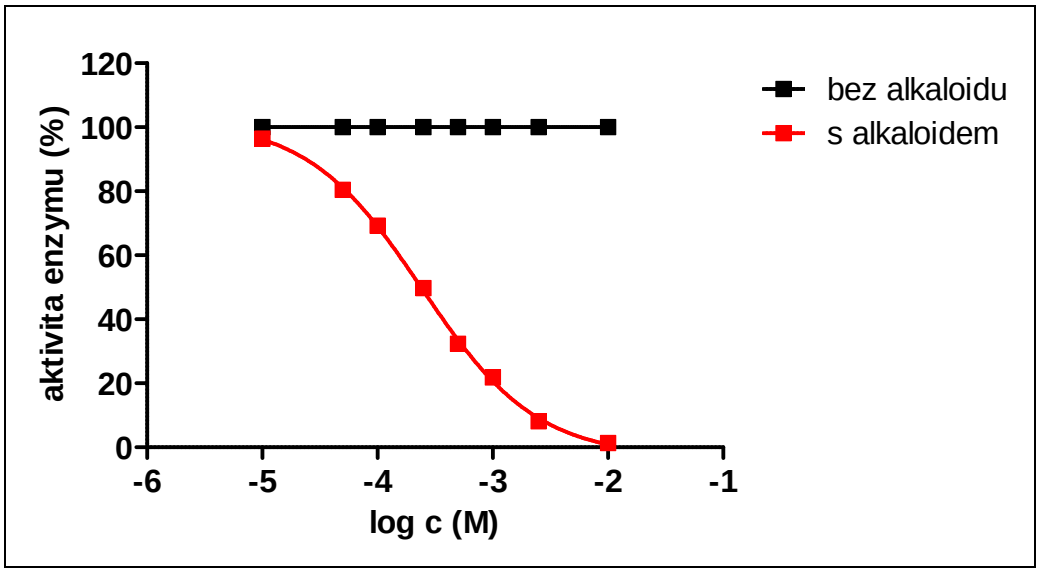
Obr. č. 48: Souhrn inhibiční aktivity eserinu s BUCHE



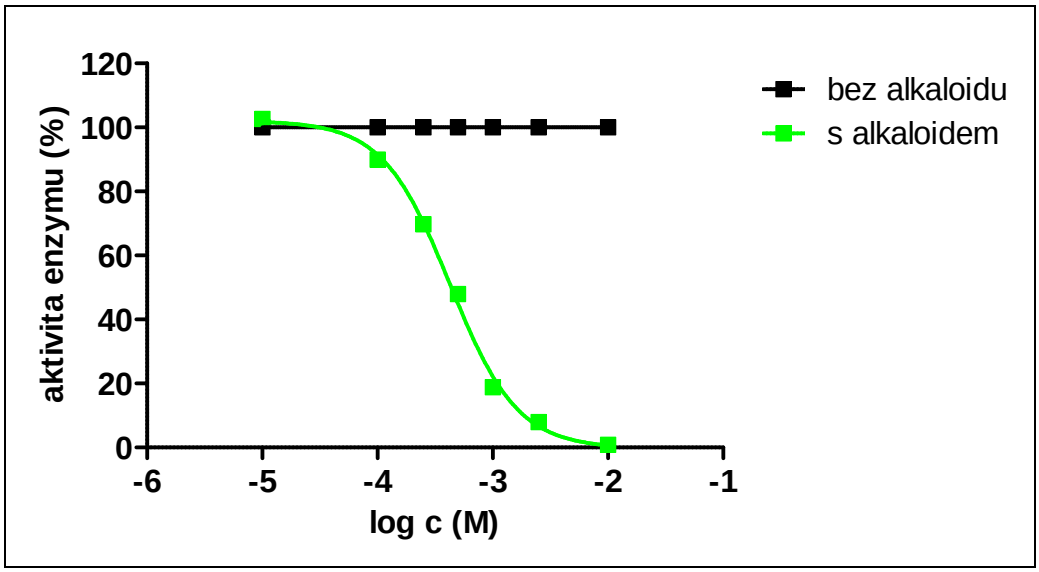
Obr. č. 49: Harman v DMSO/H_2O s BUCHE



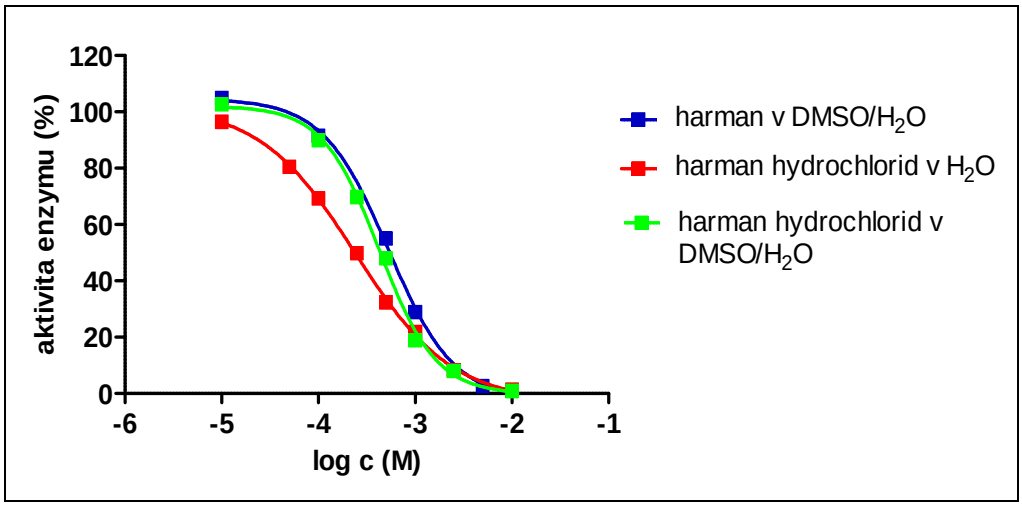
Obr. č. 50: Harman hydrochlorid v H_2O s BUCHE



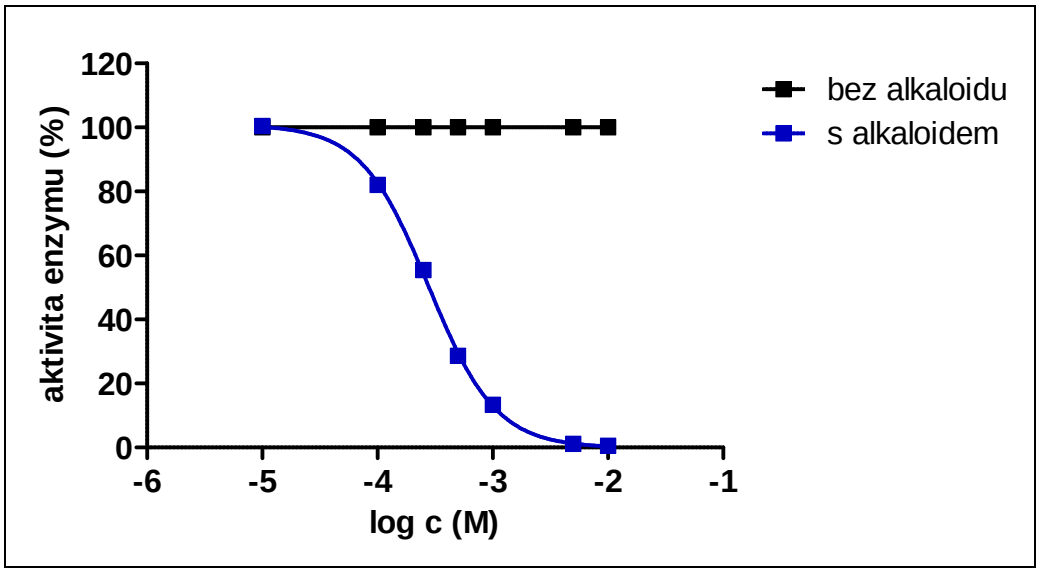
Obr. č. 51: Harman hydrochlorid DMSO/H_2O s BUCHE



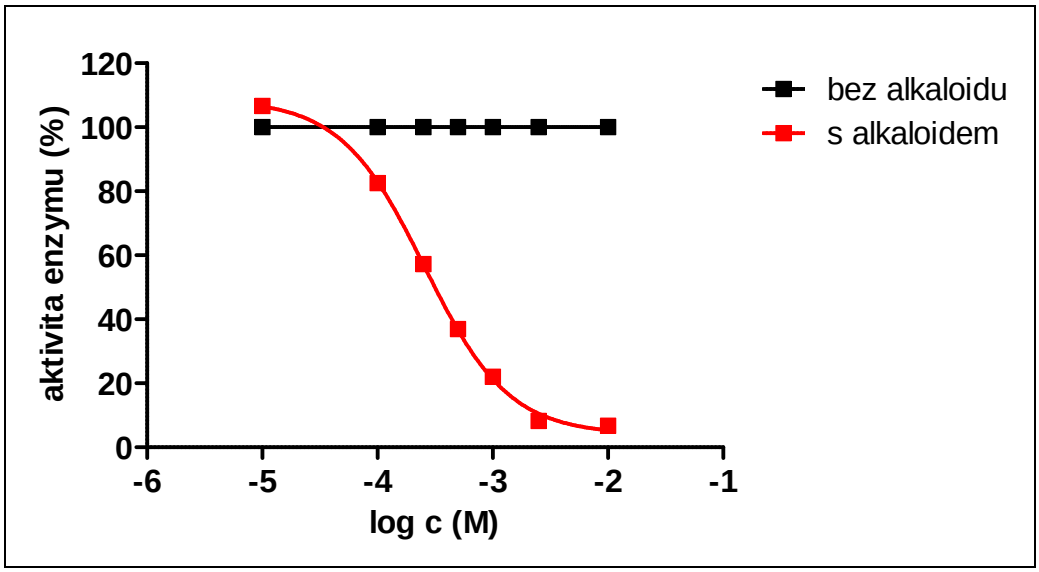
Obr. č. 52: Souhrn inhibiční aktivity harmanu s BUCHE



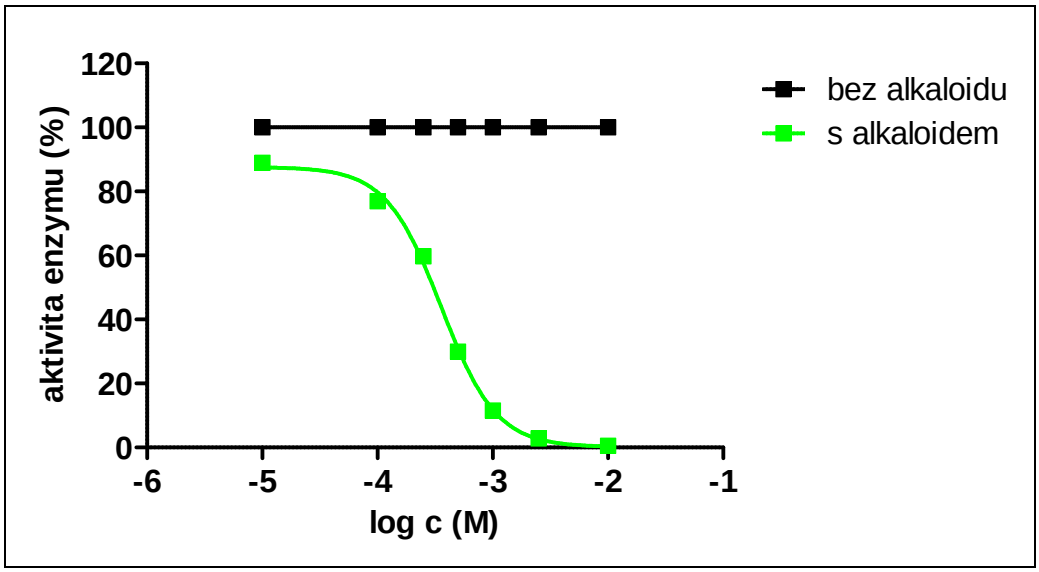
Obr. č. 53: Harmin v DMSO/H_2O s BUCHE



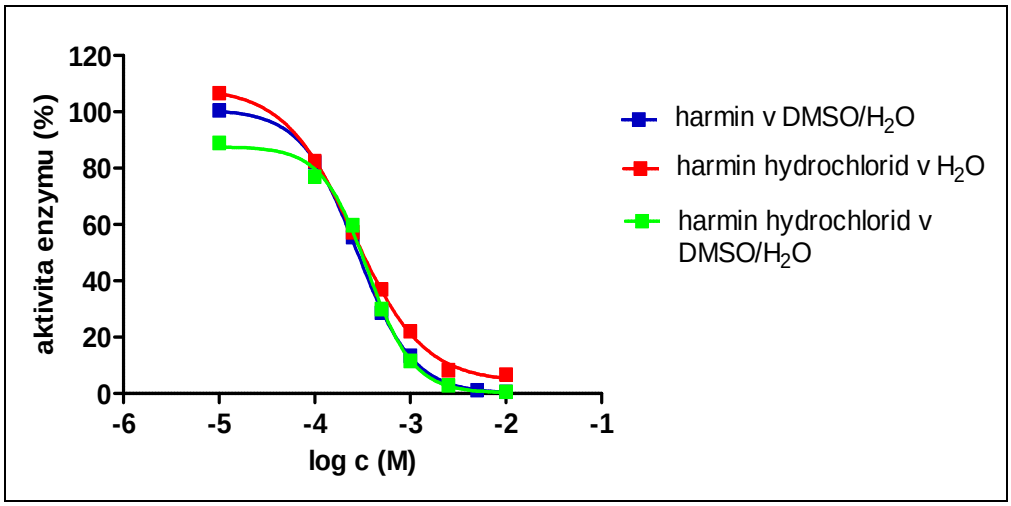
Obr. č. 54: Harmin hydrochlorid v H_2O s BUCHE



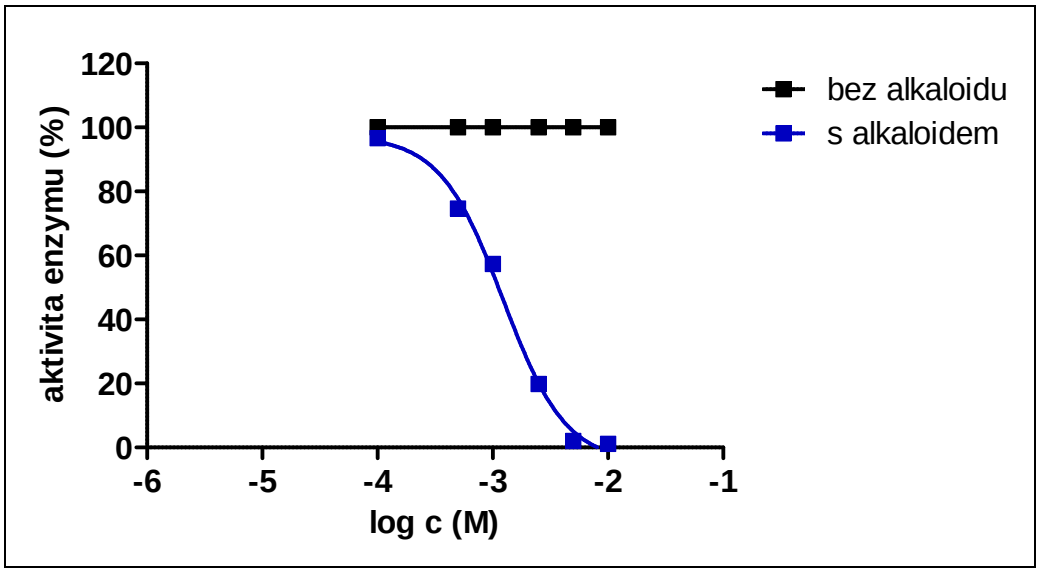
Obr. č. 55: Harmin hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE



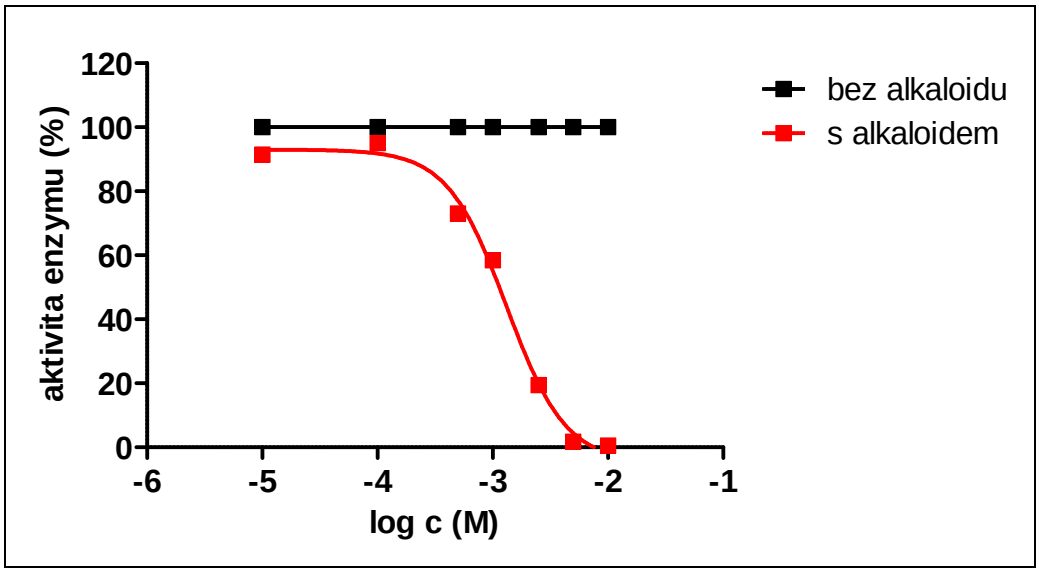
Obr. č. 56: Souhrn inhibiční aktivity harminu s BUCHE



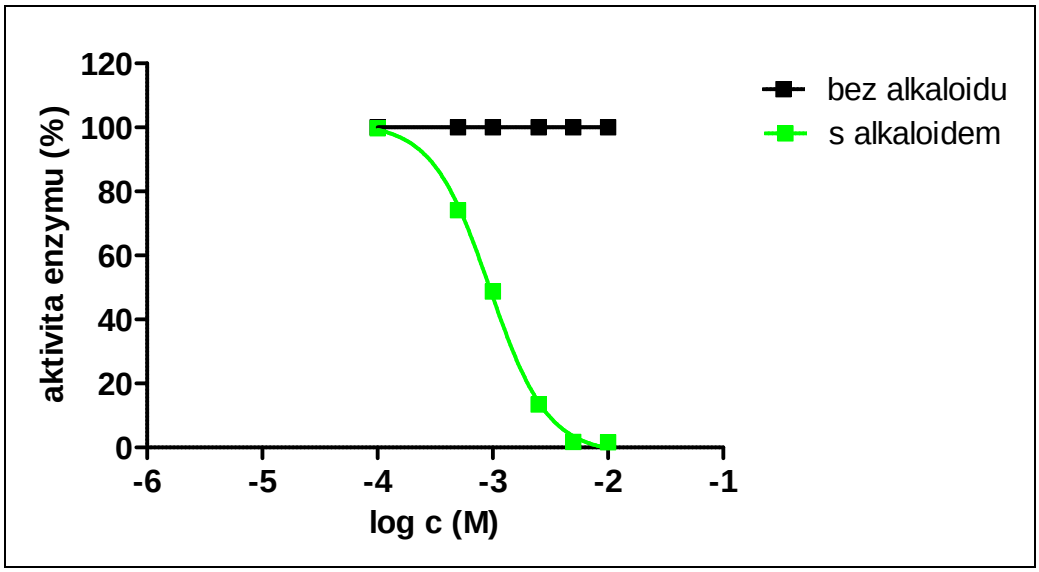
Obr. č. 57: Harmalin v DMSO/H_2O s BUCHE



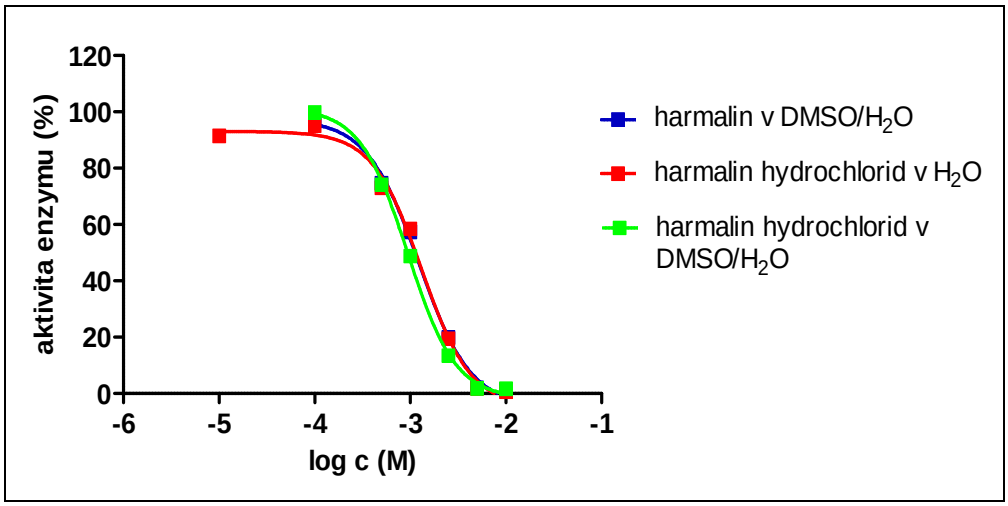
Obr. č. 58: Harmalin hydrochlorid v H_2O s BUCHE



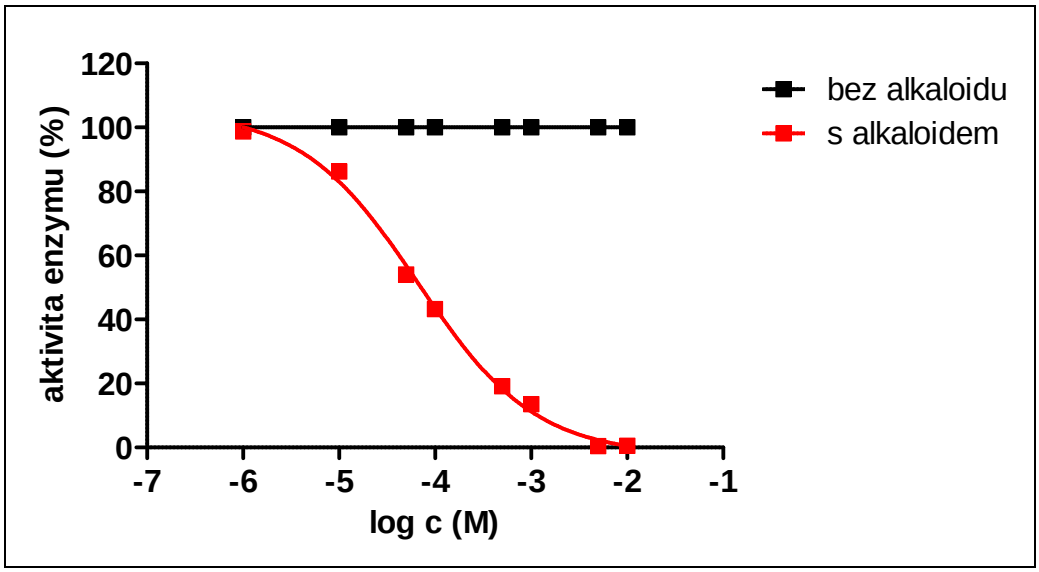
Obr. č. 59: Harmalin hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE



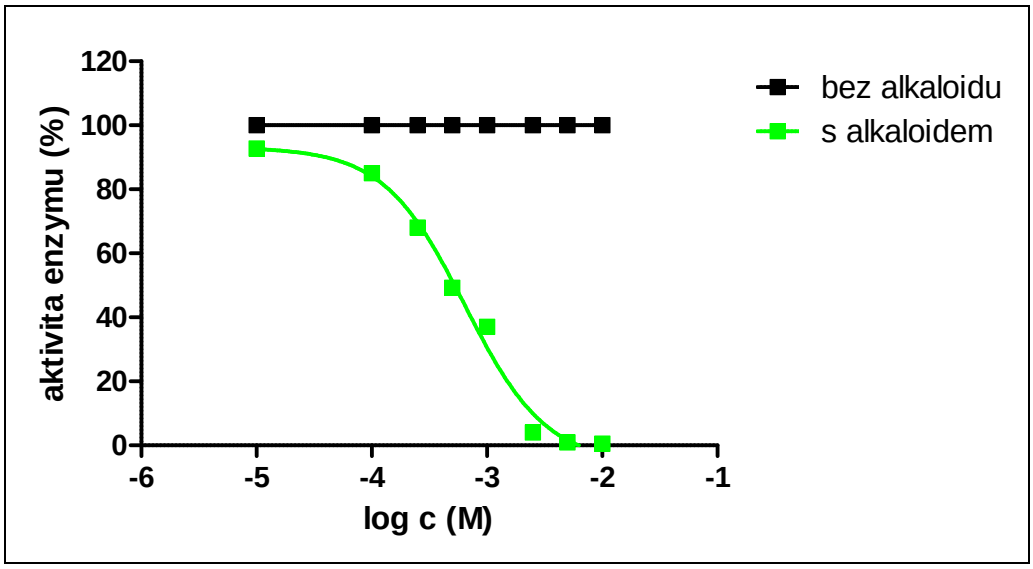
Obr. č. 60: Souhrn inhibiční aktivity harmalinu s BUCHE



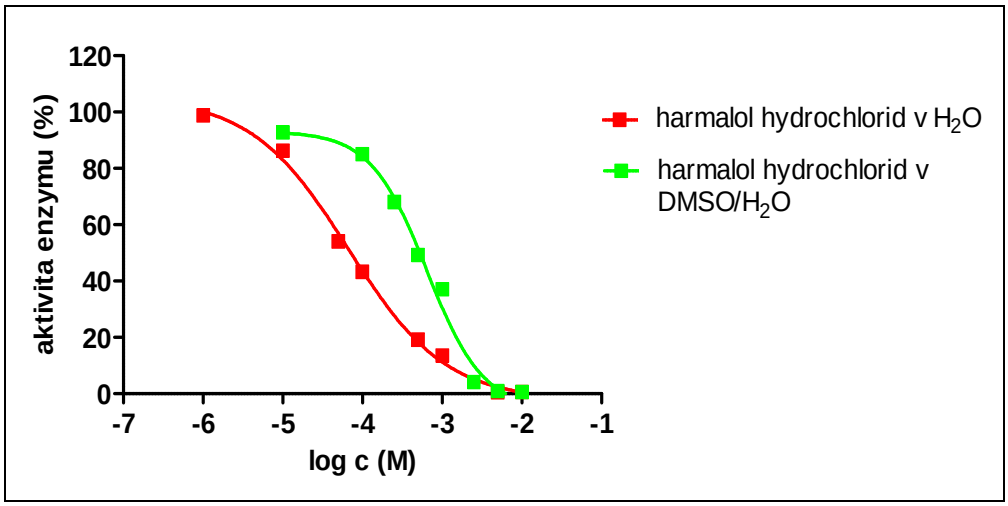
Obr. č. 61: Harmalol hydrochlorid v H_2O s BUCHE



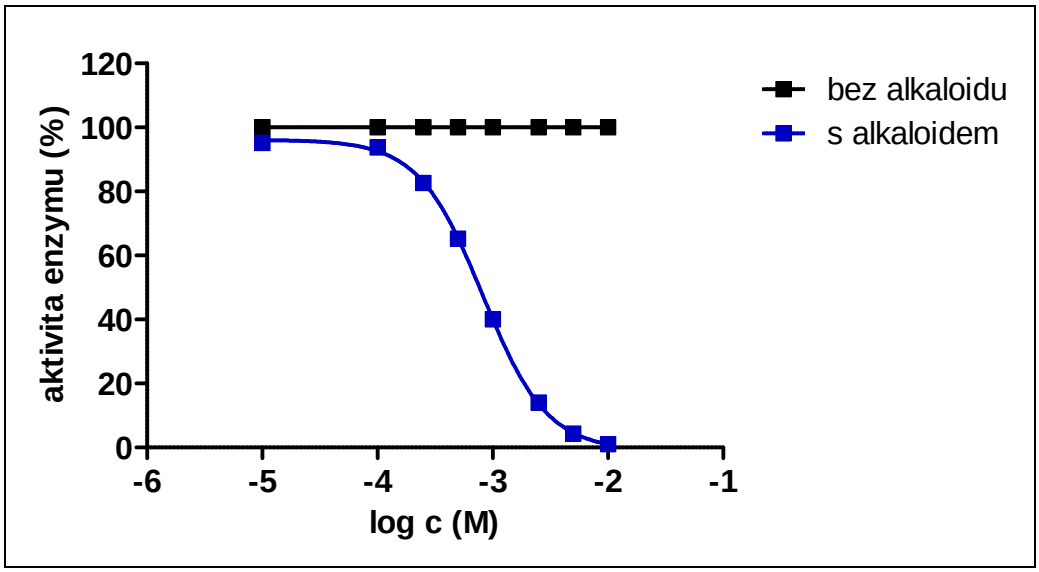
Obr. č. 62: Harmalol hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE



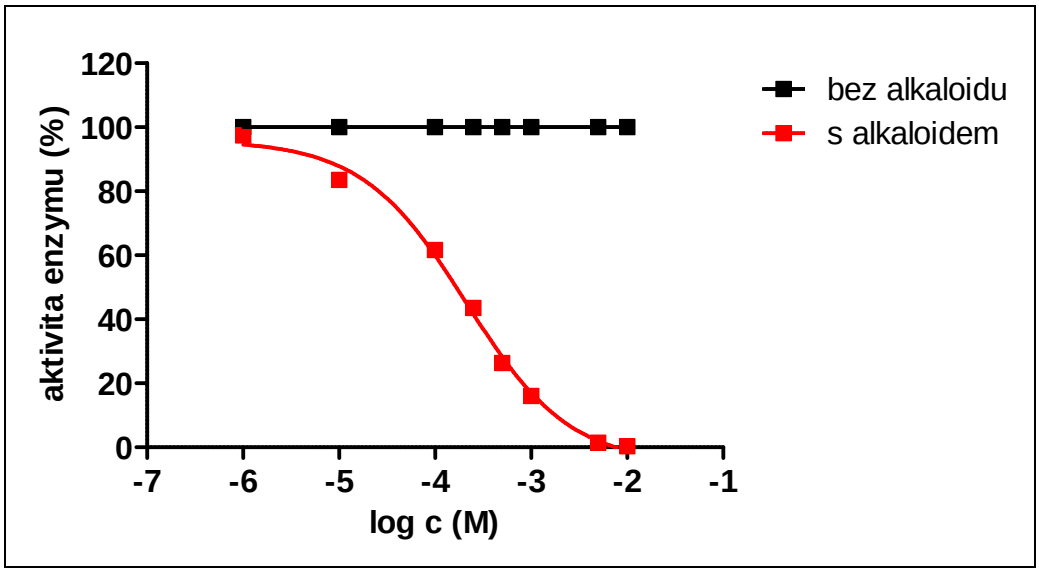
Obr. č. 63: Souhrn inhibiční aktivity harmalolu s BUCHE



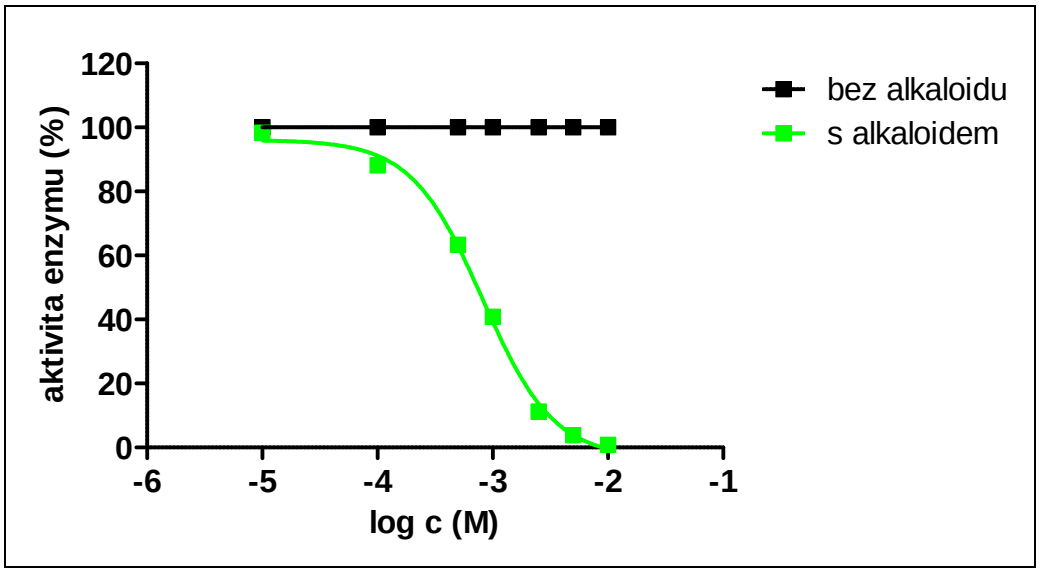
Obr. č. 64: Norharman v DMSO/H_2O s BUCHE



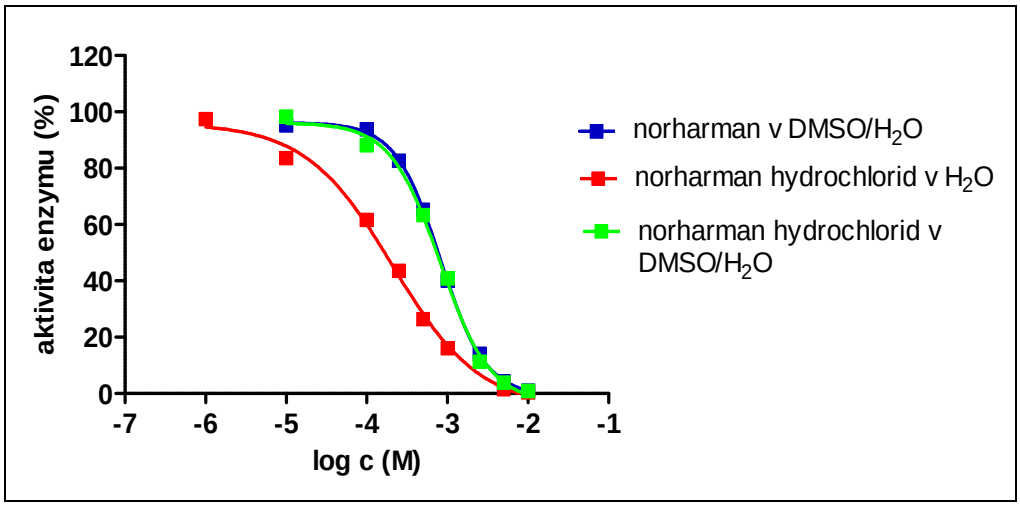
Obr. č. 65: Norharman hydrochlorid v H_2O s BUCHE



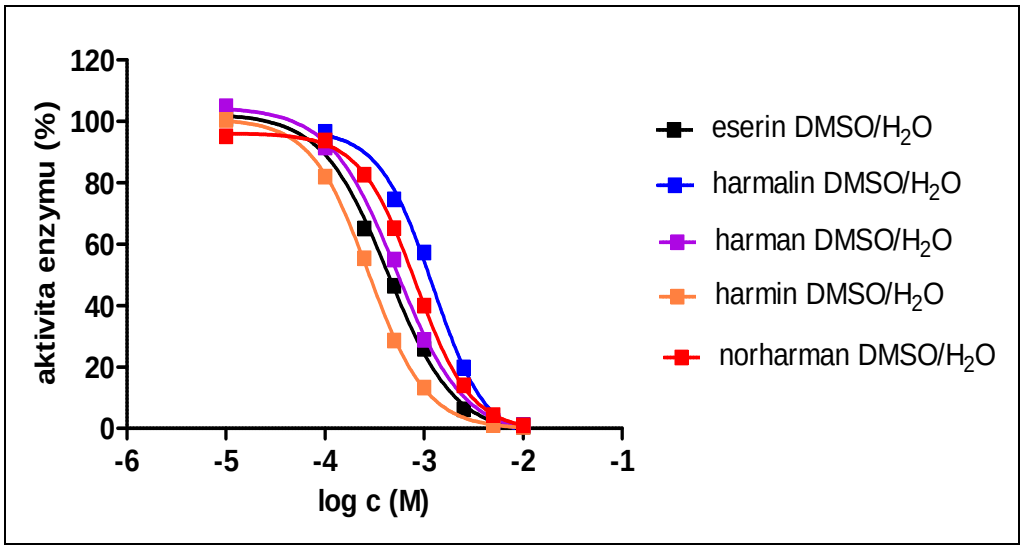
Obr. č. 66: Norharman hydrochlorid v DMSO/H_2O s BUCHE



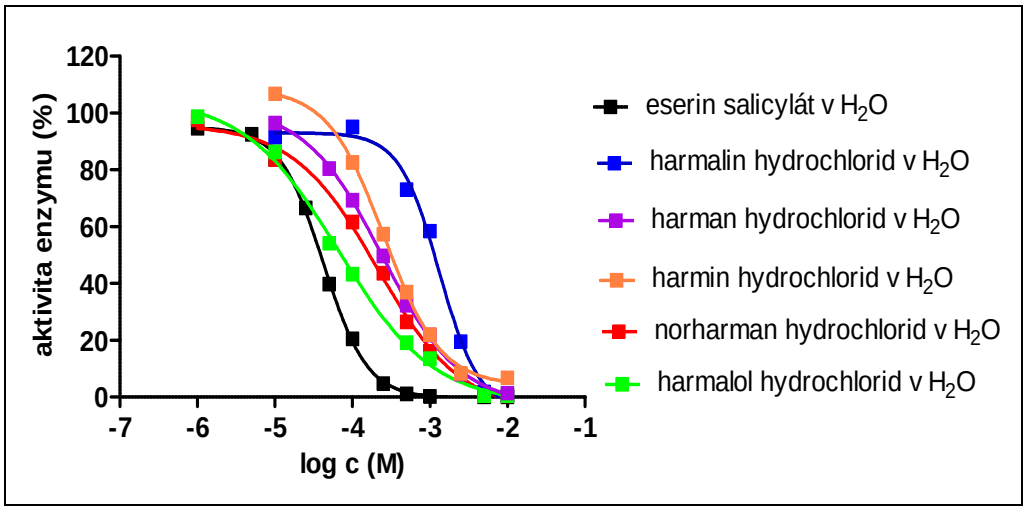
Obr. č. 67: Souhrn inhibiční aktivity norharmanu s BUCHE



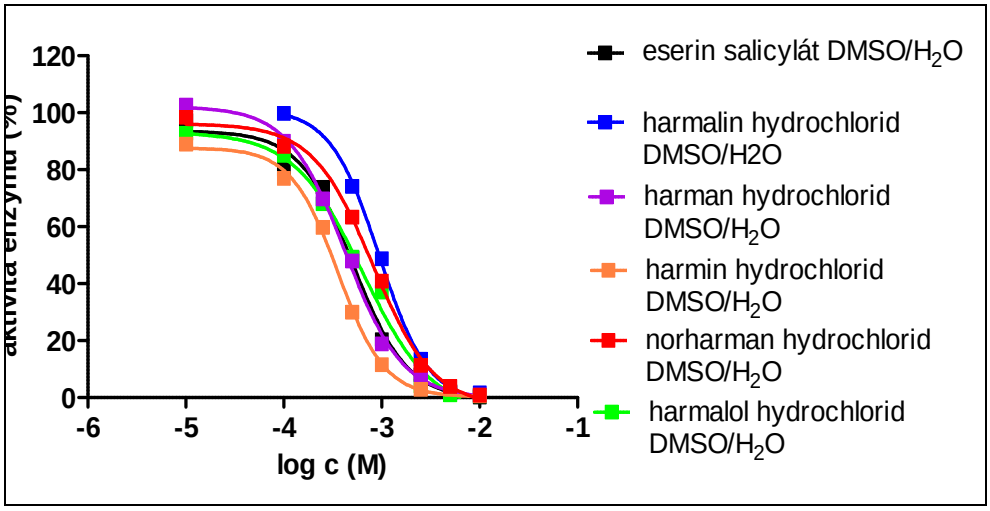
Obr. č. 68: Souhrn inhibiční aktivity alkaloidů v DMSO/H_2O s BUCHE



Obr. č. 69.: Souhrn inhibiční aktivity solí alkaloidů v H_2O s BUCHE



Obr. č. 70: Souhrn inhibiční aktivity solí alkaloidů v DMSO/H_2O s BUCHE



Hodnoty IC_{50} byly spočítány programem GrafPad.

IC_{50} = koncentrace alkaloidu, která inhibuje enzym z 50%

aktivita [1]= aktivita alkaloidu vztažená na aktivitu referenční látky eserinu

aktivita [2]= aktivita alkaloidu v souvislosti s obsahem DMSO

Tab. č. 43: Hodnoty IC_{50} alkaloidů s ACHE

alkaloid	IC 50	aktivita [1](%)	aktivita [2] (%)
harman DMSO/H_2O	1,06E-03	5,79	24,15
harman hydrochlorid H_2O	2,56E-04	9,84	100,00
harman hydrochlorid DMSO/H_2O	1,02E-03	8,33	25,10
harmin DMSO/H_2O	4,60E-04	13,34	21,96
harmin hydrochlorid H_2O	1,01E-04	24,95	100,00
harmin hydrochlorid DMSO/H_2O	4,14E-04	20,53	24,40
harmalin DMSO/H_2O	8,03E-04	7,65	37,98
harmalin hydrochlorid H_2O	3,05E-04	8,26	100,00
harmalin hydrochlorid DMSO/H_2O	9,15E-04	9,30	33,33
harmalol hydrochlorid H_2O	6,49E-04	6,50	100,00
harmalol hydrochlorid DMSO/H_2O	9,84E-04	8,64	65,96
norharman DMSO/H_2O	3,32E-03	1,85	28,13
norharman hydrochlorid H_2O	9,34E-04	2,70	100,00
norharman hydrochlorid DMSO/H_2O	9,15E-03	0,93	10,21
eserin DMSO/H_2O	6,14E-05	100,00	41,04
eserin salicylát H_2O	2,52E-05	100,00	100,00
eserin salicylát DMSO/H_2O	8,50E-05	100,00	29,65

Tab. č. 44: Hodnoty IC_{50} alkaloidů s BUCHE

alkaloid	IC_{50}	aktivita [1] (%)	aktivita [2] (%)
harman DMSO/H_2O	5,28E-04	82,00	46,02
harman hydrochlorid H_2O	2,43E-04	17,24	100,00
harman hydrochlorid DMSO/H_2O	4,27E-04	120,38	56,91
harmin DMSO/H_2O	2,78E-04	156,12	90,29
harmin hydrochlorid H_2O	2,51E-04	16,69	100,00
harmin hydrochlorid DMSO/H_2O	3,58E-04	143,58	70,11
harmalin DMSO/H_2O	1,23E-03	35,29	107,31
harmalin hydrochlorid H_2O	1,32E-03	3,17	100,00
harmalin hydrochlorid DMSO/H_2O	9,44E-04	54,45	139,83
harmalol hydrochlorid H_2O	6,65E-05	63,00	100,00
harmalol hydrochlorid DMSO/H_2O	6,44E-04	79,81	10,33
norharman DMSO/H_2O	8,18E-04	53,06	25,55
norharman hydrochlorid H_2O	2,09E-04	20,05	100,00
norharman hydrochlorid DMSO/H_2O	8,15E-04	63,07	26,64
eserin DMSO/H_2O	4,34E-04	100,00	9,65
eserin salicylát H_2O	4,19E-05	100,00	100,00
eserin salicylát DMSO/H_2O	5,14E-04	100,00	8,15

6. DISKUZE

Vzorky *Fontinalis antipyretica* byly nasbírány na vybraných lokalitách uvedených v tabulce č. 2. Z vytipovaných lokalit byl mech nalezen na řece Labi v Debrném a Metuji v Rychnovku (lokalita byla zvolena 2 km výše proti proudu řeky vzhledem k vyššímu výskytu rostliny). [95)] Na Tiché Orlici v Kunčicích mech nalezen nebyl. Na základě ústních sdělení a vlastních průzkumů byla nalezeny dvě další lokality – Dědina v Ledcích a Rokytenka v Kunvaldě.

Procentuální hodnoty celkového popela vzorků byly v jednotlivých lokalitách různé (tab. č. 3). Všechny vzorky měli větší hodnoty než je u drog běžné. Vzorek z Rokytenky dosáhl dokonce výsledku 70,13%. Důvodem tak vysokého obsahu anorganických látek v droze může být fakt, že byla sbírána celá mechová rostlina včetně příchytných vláken, na kterých zůstalo i přes důkladné očištění nepatrné množství zeminy. Dalším vysvětlením vysokého procenta celkového popela může být přítomnost vysokého podílu anorganických látek v mechu. Po reakci popela s kyselinou chlorovodíkovou se obsah popela snížil u všech vzorků zhruba na polovinu.

Obsah vlhkosti čerstvé rostliny (rostlina byla vysušena filtračním papírem) se po vysušení v sušárně při 50°C snížil na 31% (počítáno vzorcem na ztrátu sušením).

Dále byla provedena HPLC analýza jednotlivých vzorků. Všechny rostlinné vzorky byly extrahovány podle výše zmíněného postupu (kapitola 4. 3. 1.) a zanalyzovány na HPLC. Detekce byla provedena pomocí DAD a fluorescenčního detektoru. Harman a harmalin byly detekovány pomocí DAD detektoru, harmalol a harmin s použitím fluorescenčního detektoru. Pro jednotlivé alkaloidy byly zjištěny následující RT hodnoty (retenční časy) (obr. č. 7 a 8): harman 5 min 0 s, harmalol 7 min 12 s, harmin 7 min 54 s, harmalin 22 min 54 s. Standard norharmanu byl zakoupen až později a nebyl tedy do analýzy zahrnut.

Bylo zjištěno, že acetonové extrakty obsahovaly pouze stopová množství alkaloidů pod detekčním limitem fluorescenčního detektoru. Z tohoto důvodu jsou v tabulce uvedeny pouze výsledky obsahu alkaloidů v methanolových extraktech (tab. č. 4). Z provedených analýz vyplývá, že *Fontinalis antipyretica* obsahuje harmalol a harmin, přičemž množství harminu je vyšší. Z chromatogramu je patrno, že jsou v extraktu přítomny pravděpodobně ještě další látky dusíkaté povahy. Jak je uvedeno v článku Salma R. F. a kol. [14)], *Fontinalis squamosa*, rostlina příbuzná *F. antipyretica*, obsahuje deriváty harmolu. Mohlo by se tedy jednat právě o tyto látky. Standard harmolu však bohužel nebyl v čase experimentů komerčně dostupný, proto nemohla být tato domněnka potvrzena.

Množství alkaloidů v mechu (přepočteno na obsah harmalolu a harminu) jsou uvedena v tabulce č. 4. Jednotlivá množství byla vypočtena z kalibračních křivek harmalolu a harminu. Vzorky z Metuje a Rokytenky obsahovaly téměř shodné a zároveň nejvyšší množství směsi alkaloidů (0,0073% vzorek z Metuje a 0,0071% vzorek z Rokytenky). Naopak nejnižší množství alkaloidů bylo nalezeno ve vzorku z Labe (0,0008% alkaloidů). Harmalol byl detekován pouze ve vzorku z Metuje a Rokytenky, harmin byl obsažen ve všech vzorcích. Nejvyšší obsah harmalolu byl zjištěn ve vzorku z Metuje (0,0014%) a nejvíce harminu bylo objeveno ve vzorku z Rokytenky (0,0065%). V porovnání s jinými rostlinami, které harmalové alkaloidy obsahují, je obsah alkaloidů ve *F. antipyretica* nízký. Kupříkladu *Banisteriopsis caapi (Malphigiaceae)* obsahuje 2,2 % harmalových alkaloidů v kůře a 1,1% ve dřevě [111)], *Passiflora incarnata (Passifloraceae)* obsahuje těchto alkaloidů 0,01 - 0,09%. [112)]

Pro orientační zjištění inhibiční aktivity testovaných alkaloidů a extraktů byla použita TLC metoda „Fast Blue B salt“. Tento test není ovšem stoprocentní, může se stát, že látka aktivitu neprokáže a přesto ji má. Pokud má testovaná látka inhibiční aktivitu, projeví se to na TLC desce jako bílá skvrna na purpurově zbarveném pozadí.

Nejprve byla zjištěna citlivost referenčního inhibitoru, kterým byl eserin (fysostigmin). Z výsledků inhibiční aktivity bylo patrno, že na TLC lze rozeznat

inhibiční aktivitu na ACHE i BUCHE ještě při 0,01 μg eserinu na desce (obr. č. 71 a 72). Poté byl proveden test inhibiční aktivity jednotlivých alkaloidů. Alkaloidy harman, norharman, harmin a harmalol vykazovaly slabou inhibiční aktivitu na BUCHE, harmalin v použité koncentraci inhibiční aktivitu neprokázal. Harman a harmin vytvořily nejprve bílé skvrny, jak je obvyklé, po velmi krátkém čase se však skvrny zbarvily do fialova. Detekce aktivity alkaloidů na ACHE byla poněkud obtížnější, činidla nevytvořila souvislou jednolitou purpurovou barvu, nicméně v místech, kde se nacházely na TLC alkaloidy, byly patrny bílé skvrny. Nelze však s určitostí říci, že to bylo opravdu z důvodu inhibice enzymu.

Po detekci Dragendorffovým činidlem bylo potvrzeno, že inhibici ACHE i BUCHE způsobily skutečně alkaloidy. Alkaloidy se po nástřiku detekčního činidla zbarvily oranžově.

Dále byl proveden „Fast Blue B salt“ test s celkovým methanolovým a acetonovým extraktem v množství 15 μg a 150 μg na desce. Po vyvinutí obou extraktů na TLC desce bylo patrno, že složky methanolového a acetonového extraktu jsou na první pohled velice podobné, přičemž v acetonovém extraktu jsou zastoupeny ve vyšší koncentraci (obr. č. 73). Z výsledků testu vyplynulo, že oba extrakty v množství 15 μg na desce inhibiční aktivitu na ACHE ani BUCHE nemají. S použitím vyšší koncentrace, 150 μg, k inhibici ACHE rovněž nedošlo (obr. č. 75). Inhibici BUCHE však již některé složky extraktů způsobily (obr. č. 76). Zároveň bylo zjištěno, že inhibici BUCHE nezapříčinily alkaloidy, protože látky s inhibiční aktivitou nereagovaly s Dragendorffovým činidlem. Alkaloidy v extraktech s použitím vyvíjecí soustavy $CHCl_3$: MeOH 9:1 zůstaly na desce na startovní linii (slabé oranžové zbarvení) (obr. č. 74). Inhibici způsobily látky s retenčním faktorem Rf = 0,23 a 0,65. V acetonovém extraktu byly neznámé látky zastoupeny ve vyšší koncentraci.

Podobný test byl proveden týmem Martsona A. a kol. [92)] Pro testování aktivity tento tým použil methanolové extrakty z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. Do této čeledi patří rostliny známé obsahem alkaloidů s inhibičními účinky na cholinesterasy. Na desku byly naneseny jednotlivé extrakty v množství 15 μg,

použitá koncentrace enzymu byla 6,67 U/ml. Téměř všechny extrakty prokázaly inhibiční efekt na ACHE (test na BUCHE nebyl součástí práce). Lze tedy říci, že složky extraktů z *F. antipyretica* v množství 15 µg ani 150 µg nemají v porovnání s látkami obsaženými v rostlinách z čeledi *Amaryllidaceae* prakticky žádný inhibiční potenciál na ACHE.

Následně byla testována aktivita extraktů a alkaloidů pomocí upraveného Ellmanova testu s použitím spektrofotometru. Reakce činidel bez přidání inhibitoru se projeví žlutým zbarvením roztoku. Pomocí spektrofotometru se měří změna absorbance roztoku, která odpovídá rychlosti hydrolýzy substrátu katalyzované enzymem. Pokud se do roztoku přidá inhibitor enzymu, hydrolýza probíhá v menší míře a výsledná hodnota změny absorbance je nižší. Testy byly provedeny se všemi alkaloidy i extrakty navzdory tomu, že ne všechny prokázaly inhibiční aktivitu na TLC desce v testu „Fast Blue B salt".

Jako referenční látka pro stanovení inhibiční aktivity extraktů i alkaloidů byl použit eserin.

Nejprve byla testována inhibiční aktivita methanolového a acetonového extraktu na ACHE a BUCHE. Methanolový i acetonový výluh vykázaly inhibiční aktivitu na oba enzymy. V případě methanolového extraktu v koncentraci 20 mg/ml došlo k poklesu aktivity ACHE na 43,14% oproti kontrole (100%) (tab. č. 5, obr. č. 13) a u acetonového extraktu na 35,80% (tab. č. 6, obr. č. 14). Přesné hodnoty IC_{50} program GrafPad nebyl schopen určit, pravděpodobně z důvodu nedostatečného množství hodnot aktivit enzymů nižších než 50%. Změřit vyšší koncentrace extraktů nebylo možné vzhledem ke tmavému zbarvení roztoku. Referenční látka, eserin ve směsi DMSO/H_2O, jejíž inhibiční aktivita byla měřena za stejných podmínek, dosáhla hodnoty IC_{50} 0,017 mg/ml. Lze tedy říci, že inhibiční aktivity obou extraktů na ACHE jsou v porovnání se standardem zhruba 1000krát nižší.

Inhibiční aktivita extraktů na BUCHE již byla rozdílná. Methanolový extrakt v koncentraci 20 mg/ml snížil aktivitu enzymu oproti kontrole (100%) na 65,63% (tab. č. 7, obr. č. 16) (přesnou hodnotu IC_{50} program opět nebyl schopen určit), acetonový na 0,44% (tab. č. 8, obr. č. 17), IC_{50} acetonového extraktu dosáhla

hodnoty 9,716 mg/ml. Hodnota IC_{50} eserinu ve směsi DMSO/H_2O na BUCHE byla zjištěna 0,093 mg/ml. V případě metanolového extraktu je to tedy zhruba 200krát nižší inhibiční aktivita, u acetonového extraktu 100krát nižší inhibiční aktivita.

Z výsledků vyplývá, že lepší inhibiční aktivitu na ACHE i BUCHE má acetonový extrakt, přičemž nejvyšší aktivitu vykazuje acetonový extrakt na BUCHE. Výsledky tedy potvrdily výsledky inhibiční aktivity extraktů TLC desce.

Tým pod vedením Orhana I. testoval pomocí upraveného Ellmanova testu inhibiční aktivitu methanolicko-chloroformových extraktů (1:1) tureckých léčivých rostlin na ACHE i BUCHE. Již v koncentraci 1 mg/ml vykazovaly všechny použité extrakty inhibiční aktivitu na ACHE i BUCHE, většina z nich inhibovala více než 50% aktivity obou enzymů. Jako referenční látka byl použit galanthamin, který inhiboval v koncentraci 1 mg/ml 48,80% aktivity ACHE a 80,31% aktivity BUCHE. Lze tedy říci, že inhibiční aktivity methanolových extraktů byly srovnatelné s inhibiční aktivitou galanthaminu. V porovnání s eserinem má galanthamin osmkrát nižší inhibiční aktivitu na ACHE a desetkrát nižší aktivitu na BUCHE. Inhibiční aktivita methanolového a acetonového extraktu z *F. antipyretica* je tedy v porovnání s uvedenými údaji poměrně nízká. [113, 114)]

Při testování inhibiční aktivity alkaloidů na ACHE a BUCHE pomocí Ellmanova testu byla testována aktivita bází alkaloidů rozpuštěných ve směsi DMSO/H_2O, solí alkaloidů rozpuštěných v H_2O a solí alkaloidů rozpuštěných ve směsi DMSO/H_2O (tab. č. 9 - 44, obr. č. 19 – 70). DMSO je jedno z organických rozpouštědel, které se používá při Ellmanově testu. Bylo ovšem zjištěno, že ovlivňuje nejen aktivitu enzymu, ale také samotné alkaloidy. [115)] Součástí této práce bylo určit, jak DMSO ovlivňuje inhibiční aktivitu v případě β-karbolínových alkaloidů.

Výsledné hodnoty inhibiční aktivity jednotlivých β-karbolínových alkaloidů pak byly vztáhnuty k eserinu, jehož aktivita byla brána jako stoprocentní.

Nejprve byly provedeny testy na ACHE, a to se solemi alkaloidů rozpuštěnými v H_2O. Naměřená hodnota IC_{50} eserinu na ACHE za uvedených podmínek byla 2,52E-05 M. Nejvyšší aktivitu vykazoval harmin hydrochlorid,

IC_{50} = 1,01E-04 M, což je 24,95% aktivity eserinu salicylátu. Ostatní soli alkaloidů vykazovaly aktivitu nižší než 10% aktivity referenční látky.

Při měření inhibiční aktivity eserinu v DMSO/H_2O na ACHE byla naměřena IC_{50} 6,14E-05 M. Inhibiční aktivita se tak snížila na 41,04% původní aktivity soli v H_2O. Nejvyšší aktivitu vykazoval opět harmin, IC_{50} = 4,60E-04 M, což je 13,34 % aktivity eserinu. Ostatní báze alkaloidů měli opět aktivitu nižší než 10% aktivity eserinu. Jejich inhibiční aktivita byla procentuelně ještě nižší v porovnání s aktivitou solí v H_2O.

IC_{50} eserinu salicylátu v DMSO/H_2O byla 8,50E-05 M, což je 29,65% aktivity eserinu salicylátu v H_2O. Nejvyšší aktivitu vykazoval opět harmin, IC_{50} = 4,14E-04 M, což je 20,53% aktivity referenční látky. Inhibiční aktivita ostatních alkaloidů byla opět nižší než 10% aktivity eserinu salicylátu v DMSO/H_2O.

Inhibiční aktivita eserinu jako referenční látky byla ve všech třech případech nejvyšší. Ze zkoušených alkaloidů vykázal nejvyšší inhibiční aktivitu harmin. Pro to, aby se tato látka dala využít pro terapii AD, je však jeho inhibiční aktivita poměrně slabá. Ostatní alkaloidy vykázaly aktivitu pod 10% v porovnání s referenční látkou, což v porovnání s inhibiční aktivitou jiných alkaloidů rovněž nejsou významné hodnoty. Kupříkladu waltherin, alkaloid izolovaný z brazilské rostliny *Walteria brachypellata (Sterculiaceae),* v koncentraci 100 µg/ml dosahuje 72,20% aktivity eserinu [116)] a IC_{50} huperzinu A je dokonce třikrát nižší než eserinu.[114)]

Řešením nízké aktivity β-karbolínových alkaloidů by mohla být obměna jejich základních struktur a syntéza účinnějších derivátů. Výzkumy s touto tématikou už v současné době probíhají.

Měřením inhibičních aktivit β-karbolínových alkaloidů na ACHE se zabýval také tým pod vedením Skupa M.. Pro harman byla v koncentraci 1E-04 zjištěna inhibiční aktivita 66,6%, pro norharman ve stejné koncentraci 59,1%. Tyto výsledky se od výsledků uvedených v této dizertační práci poměrně liší (inhibiční aktivita harmanu byla zjištěna 30,87%, norharmanu 9,33%). Důvodem je pravděpodobně fakt, že byla použita acethylcholinesterasa izolovaná z bovinních erytrocytů (v této

dizertační práci byla použita ACHE z *Electrophorus electricus*) a také podmínky reakce byly odlišné. [90)]

Výsledky inhibičních aktivit alkaloidů v testu „Fast Blue B salt“ nebyly průkazně pozitivní. Jak se ukázalo v Ellmanově testu, inhibiční aktivita alkaloidů byla pravděpodobně natolik nízká, že se v v testu „Fast Blue B salt“ neprojevila.

Výsledky inhibice alkaloidů s BUCHE byly různorodější. IC_{50} eserinu salicylátu v H_2O na BUCHE byla naměřena 4,19E-05 M. Látkou s nejvyšší inhibiční aktivitou byl harmalol hydrochlorid s IC_{50} 6,65E-05 M, což je 63% aktivity eserinu salicylátu. Další alkaloidy vykazovaly aktivitu kolem 20% aktivity eserinu salicylátu, jen harmalin hydrochlorid měl aktivitu pouze 3,17%.

IC_{50} eserinu v DMSO/H_2O byla 4,34E-04 M, což je 9,65% aktivity oproti eserinu salicylátu v H_2O. IC_{50} harminu byla dokonce 2,28E-04 M, což je 156,12% aktivity eserinu za stejných podmínek. Také další alkaloidy vykazovaly poměrně vysokou aktivitu. Nejnižší aktivitu měl harmalin, IC_{50} = 1,23E-03 M, což je 35,29% aktivity eserinu.

IC_{50} aktivity eserinu salicylátu v DMSO/H_2O byla 5,14E-04 M, což je 8,15% aktivity eserinu salicylátu v H_2O. Nejvyšší aktivitu vykazoval harmin hydrochlorid, IC_{50} = 3,58E-04 M, což je 143,58% aktivity eserinu salicylátu. Také harman hydrochlorid vykazoval vyšší aktivitu než eserin salicylát, 4,27E-04 M, což je 120,38% aktivity eserinu salicylátu. Nejnižší aktivitu měl opět harmalin hydrochlorid, IC_{50} = 9,44E-04 M, což je 54,45% aktivity eserin salicylátu.

Jako nejlepší inhibitor na BUCHE se ukázal ve vodném prostředí harmalol, ve směsi DMSO/H_2O harmin. Jak již bylo zmíněno, inhibice BUCHE se pro léčbu AD, s výjimkou pozdních stavů, považuje spíše za nežádoucí. Nejnižší inhibiční aktivitu ve vodném prostředí vykázal harmalin, je zhruba stokrát slabší inhibitor BUCHE než eserin. Pro porovnání, inhibiční aktivita huperzinu A je oproti eserinu šedesátkrát nižší. [114)] Harmalin je tedy látka s nízkou inhibiční aktivitou na BUCHE, zároveň je však bohužel velmi slabým inhibitorem ACHE (8,26% v porovnání s eserinem salicylátem) a pro běžnou terapii AD je tedy tato látka nedostačující.

Zjištěné výsledky inhibiční aktivity alkaloidů na BUCHE v Ellmanově testu korespondují s výsledky orientačních inhibičních aktivit na TLC desce s použitím testu „Fast Blue B salt“. Inhibiční aktivita harmalinu se ukázala velice slabá, proto tedy na TLC desce tento alkaloid inhibici neprokázal.

Je patrno, že přídavek DMSO podstatně změnil výsledek inhibiční aktivity. DMSO působí jako inhibitor ACHE a BUCHE, předpokladem je tedy zvýšení inhibiční aktivity látek rozpuštěných v tomto rozpouštědle. V článku Giovanniho S. a kol. byl zkoumán efekt DMSO na Michaelisovu konstantu K_m, na maximální rychlost reakce V_{max} a na inhibiční aktivitu látek. Bylo zjištěno, že přídavek DMSO zvýšil hodnoty K_m a V_{max}, DMSO působil jako inhibitor. DMSO také ovlivnil aktivitu přidaných inhibitorů. Ještě při koncentraci 1,6% DMSO ve směsi aktivitu alkaloidů mnoho neovlivňoval, nicméně přesto došlo k mírnému poklesu IC_{50}. [115)]

Při pokusech s ACHE v této práci byl však pozorován efekt přímo opačný, přídavek DMSO hodnoty IC_{50} zvyšoval. Použitá koncentrace DMSO v této práci byla 65,79%. Nejstabilnější byl vůči vlivu DMSO harmalol hydrochlorid v DMSO/H_2O, jeho aktivita poklesla v porovnání s harmalolem hydrochloridem rozpuštěným pouze ve vodě na 65,96%, naopak nejméně stabilní byl harmin, jehož aktivita poklesla na 21,96%.

Při pokusech s BUCHE se projevil efekt popsaný v článku, u harmalinu došlo ke zvýšení inhibiční aktivity (harmalin 107,31%, harmalin hydrochlorid v DMSO/H_2O 139,83%). Harmalin se tedy zdá být vůči vlivu DMSO nejodolnější. U ostatních alkaloidů se však aktivita opět snížila, nejvyšší pokles aktivity byl zaznamenán u eserinu (eserin salicylát v DMSO/H_2O 8,15%), ze zkoumaných alkaloidů byl nejméně stabilní harmalol hydrochlorid, jehož aktivita poklesla ve směsi DMSO/H_2O na10,33%.

Rozdíly v aktivitě bází a solí ve směsi DMSO/H_2O byly nepatrné. Pouze u norharmanu a norharmanu hydrochloridu s ACHE byl rozdíl nápadnější, hodnota IC_{50} norharmanu činila 3,32E-03 M a IC_{50} norharmanu hydrochloridu 9,15E-03 M.

Důvodem zvýšení IC_{50}, s čímž souvisí snížení inhibiční aktivity, je pravděpodobně fakt, že DMSO částečně rozložil složky reakce. V úvahu připadá inhibitor a substrát.

Jak se tedy ukázalo, DMSO není vzhledem k poměrně velkému ovlivňování inhibiční aktivity β-karbolínových alkaloidů nejvhodnější rozpouštědlo. Bylo by tedy výhodné nalézt vhodnější rozpouštědlo, které by inhibiční aktivitu těchto látek ovlivňovalo co nejméně a zároveň je dobře rozpouštělo. V úvahu připadají kupříkladu alkoholová rozpouštědla (methanol a ethanol), popřípadě jejich směsi s vodou či jinými rozpouštědly.

7. ZÁVĚR

- vodní mech *Fontinalis antipyretica (Fontinalaceae)* byl nalezen v lokalitách Dědina (Ledce), Labe (Debrné), Metuje (Rychnovek) a Rokytenka (Kunvald).
- nejvyšší celkový obsah alkaloidů, počítáno na obsah harminu a harmalolu, byl zjištěn ve vzorku z Metuje (0,0073%), nejvíce harmalolu bylo objeveno ve vzorku z Metuje (0,0014%), nejvíce harminu obsahoval vzorek z Rokytenky (0,0065%).
- byla vypracována HPLC metoda pro analýzu β-karbolínových alkaloidů. Eluce byla izokratická, analýza probíhala 33 minut, mobilní fáze byla složena ze 70% z methanolu a z 30 % z fosfátového pufru pH 7,8. Průtok mobilní fáze v průběhu analýzy vzrůstal ze 1,1 ml/min v čase 0 do 1,5125 ml/min v čase 33 min.
- v testu „Fast Blue B salt“ alkaloidy inhibiční aktivitu na ACHE průkazně neukázaly, na BUCHE všechny alkaloidy kromě harmalinu inhibiční aktivitu měly.
- methanolový ani acetonový extrakt v testu „Fast Blue B salt“ aktivitu na ACHE neukázaly, na BUCHE oba extrakty aktivitu měly, acetonový extrakt byl účinnější. Inhibici enzymů však nezpůsobily alkaloidy, ale látky s Rf = 0,23 a 0,65.
- u extraktů byla vyšší inhibiční aktivita na ACHE i BUCHE s použitím Ellmanovy metody zjištěna u acetonového extraktu, přičemž nejvyšší aktivitu ukázal acetonový extrakt na BUCHE.
- z alkaloidů vykazoval v Ellmanově testu nejvyšší inhibiční aktivitu na ACHE v porovnání s eserinem v H_2O harmin hydrochlorid, ve směsi DMSO/H_2O harmin ve formě báze i soli harmin. Nejvyšší inhibiční aktivitu na BUCHE vykazoval v H_2O harmalol hydrochlorid, v DMSO/H_2O harmin ve formě báze i soli.
- vůči vlivu DMSO byl s ACHE nejodolnější harmalol hydrochlorid, naopak nejméně stabilní byl harmin. S BUCHE byl nejstabilnější harmalin, nejméně stabilní byl harmalol hydrochlorid. Rozdíly v aktivitě bází a solí alkaloidů ve směsi DMSO/H_2O byly nepatrné. Pouze u norharmanu a norharmanu hydrochloridu s ACHE byl rozdíl nápadnější.

8. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

Zkratky jsou vysvětleny v češtině. Pouze u výrazů, které nemají český překlad, nebo se český překlad nepoužívá, jsou u zkratek uvedeny názvy anglické.

5-HT_{1-4}	serotoninové receptory
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AD	Alzheimerova choroba
ACH	acetylcholin
ACHE	acetylcholinesterasa
ACHEI	inhibitory acetylcholinesterasy
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ATCHI	acetylthiocholin jodid
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
BUCHE	butyrylcholinesterasa
BUTCHI	butyrylthiocholin jodid
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenasa typu 2
CYP 11 a 17	cytochrom 11 a17
DAD	diode array detektor
D_1, D_2	dopaminové receptory
DMCM	methyl-6,6-dimethoxy-4-ethyl-β-karbolín-3-karboxylát
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT	N,N-dimethyltryptamin

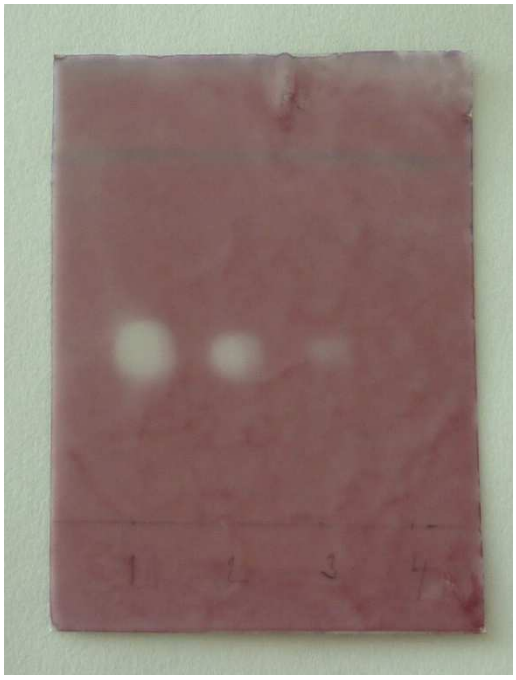
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
E, [E]	enzym, koncentrace enzymu
Ea	aktivační energie
EEG	elektroencefalogram
EI, [EI]	komplex enzym-inhibitor, koncentrace komplexu enzym-inhibitor
EP	komplex enzym-produkt
ES, [ES]	komplex enzym-substrát, koncentrace komplexu enzym-substrátu
ESI, [ESI]	komplex enzym-substrát-inhibitor, koncentrace komplexu enzym-substrát- inhibitor
FAD	flavin-adenosin-dinukleotid
FP	fluorescenční detektor
GABA	kyselina gamaaminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
HEM	hematoencefalická membrána
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHE	cholinesterasy
I, [I]	inhibitor, koncentrace inhibitoru
I_1, I_2	imidazolinové receptory
IC_{50}	koncentrace látky, která způsobí inhibici enzymu z 50%
IDO	indolamin –2,3-dioxygenasa
IκB kinasa	inhibitor κB kinasa
KA	kainátový receptor
kat	katal
Ki	inhibiční konstanta

Km	Michaelisova konstanta
l	délka kyvety
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
LTM	long-term-memory
MAO A a B	monoaminooxidasa A a B
Mg-ATP	hořečnatá sůl adenosintrifosfátu
MK	mastná kyselina
MPP+	N-methyl-4-fenylpyridinium
MPTP	(N-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NF-κB	nuklear factor kapa B
NMDA	N-methyl-D-aspartate receptor
NO	oxid dusnatý
P	produkt
P450	cytochrom
PD	Parkinsonova choroba
PDE	fosfodiesterasa
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gama
PUFA	omega-3-nenasycené kyseliny
rcp	receptor
RT	retenční čas
S,[S]	substrát, koncentrace substrátu
SCE	sister chromatid exchange
SH-SY5Y	linie lidských neuroblastomů odvozená z rakovinových metastáz v kostní dřeni
smodch	směrodatná odchylka
SN	substantia nigra
STM	short-term-memory

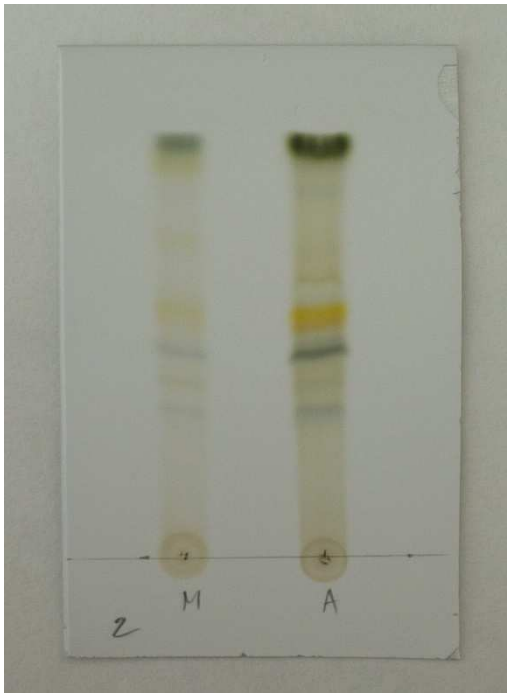
TA 98	kmen buněk ze *Salmonella typhimurium*
TaClo	1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-karbolín
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNB^-	5-merkapto-2-nitrobenzoátový aniont
U	jednotka aktivity enzymu
V_{max}	maximální rychlost
β-CCM	methyl-β-karbolín-3-karboxylát
Δ A/min	změna absorbance za minutu
ε	molární absorpční koeficient

9. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

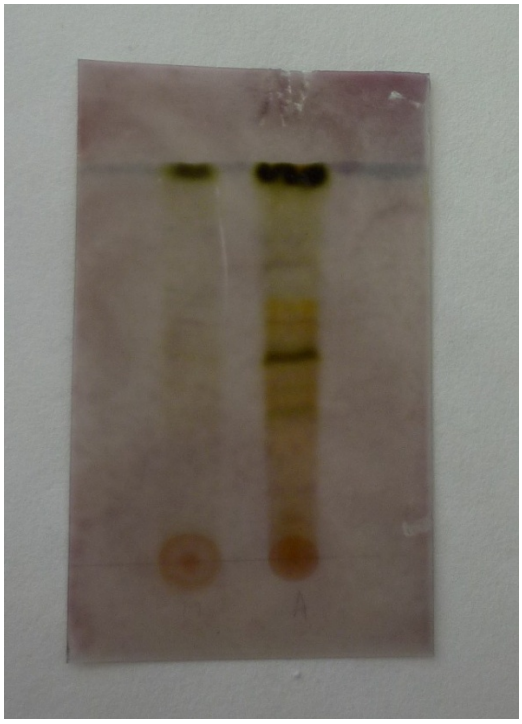
Obr. č. 71 a 72: Test „Fast Blue B salt“ eserinu s ACHE (č. 71) a BUCHE (č. 72) (1 - 4 odpovídá 1 - 0,001 µg eserinu na desce)

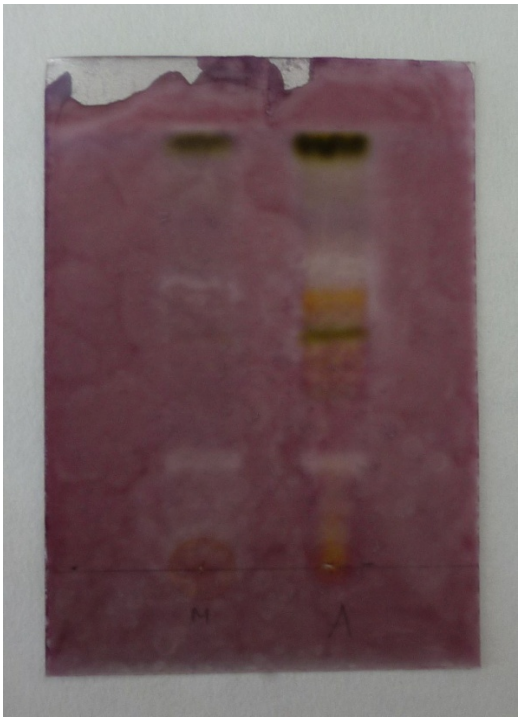


Obr. č. 73 a 74: TLC methanolového a acetonového extraktu (č. 73), s Dragendorffovým činidlem (č. 74) (M = methanolový extrakt, A = acetonový extrakt)



Obr. č. 75 a 76: Test „Fast Blue B salt“ methanolového a acetonového extraktu s ACHE (č. 75) a BUCHE (č. 76) (M = methanolový extrakt, A = acetonový extrakt)





10. POUŽITÁ LITERATURA

1. Schott Y. et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 5840-5843 (2006).

2. Kamal M. A. et al.: Biochim. Biophys. Act. 1760, 200-206 (2006).

3. Rabšteinek O., Poruba M. a Skuhrovec J.: Lišejníky, mechorosty a kapraďorosty ve fotografii, Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1987, s. 172.

4. Kremer B. K. a Muhle H.: Lišejníky, mechorosty, kapraďorosty, Ikar, Praha 1998, s. 190.

5. Holá E.: Bakalářská práce: Bryoflóra horního toku řeky Křemelné na Šumavě, Biologická fakulta Jihočeské university České Budějovice, České Budějovice 2006, s. 20.

6. Kučera J. et al.: Čas. Slez. Muz. Opava (A) 53, 143-173 (2004).

7.http://hydro.chmi.cz/isarrow/objects.php?objekty_biodata=1&taxon=Fontinalis%20antipyretica (3.8.2010).

8. http://www.biolib.cz/cz/taxon/id91102/ (3.8.2010).

9. Kučera J. and Váňa J.: Preslia, Praha 75, 193–222 (2003).

10. V. K.: Český herbář, nakladatelství Alois Hynek, Praha 1899, s. 256.

11. Siebert A. et al.: Sci. Total Environ. 177, 137-144 (1996).

12. Delépée R., Pouliquen H. and Bris H. L.: Sci. Total Environ. 322, 243-253 (2004).

13. Kalacheva G. S. et al.: Russ. J. Plant Physiol. 56, 795–807 (2009).

14. Salm R. F., Zinsmeister H. D. and Eicher T.: Phytochemistry 49, 887-892 (1998).

15. Veljić M. et al.: Arch. Biol. Sci. 61, 225-229 (2009).

16. Allen J. R. F. and Holmested B. R.: Phytochemistry 19, 1573-1582 (1980).

17. Adachi J. et al.: J. Chromat. 538, 331-339 (1991).

18. Gross G. A. et al.: Carcinogenesis 14, 2313-2318 (1993).

19. Herraiz T., Huang Z. and Ough C. S.: J. Agric. Food Chem. 41, 455-459 (1993).

20. Totsuka Y. et al.: Cancer Lett. 143, 139-143 (1999).

21. Zheng W. et al.: Anal. Biochem. 279, 125-129 (2000).

22. May T. et al.: Arch. Pharmacol. 349, 308 (1994).

23. Manske R. H. F.: The Alkaloids Chemistry and Physiology Vol. 8, Academic Press INC, London 1965, s. 48.

24. Jiménez J. et al.: Experiment. Toxicol. Pathol. 60, 381-389 (2008).

25. Freedland C. S. and Mansbach R. S: Drug Alcohol Depend. 54, 183-194 (1999).

26. Boeira J. M. et al.: Mutat. Res. 500, 39-48 (2002).

27. Glennon R. A. et al: Drug and Alcohol Depend. 60, 121-132 (2000).

28. Volk R. B. : Microbiol. Res. 163, 307-313 (2008).

29. Moura D. J. et al.: Mutagenesis 22, 293-302 (2007).

30. Höschl C. a kol.: Symposium 1, Alzheimerova choroba, Galén, Edice Symposium, Praha 1999, s. 10, 13, 16-18, 59-63, 67-70

31. Sánchez del Campo L. F. et al.: Neurochem. Int. 50, 531-539 (2007).

32. Masson P. et al.: Biochim. Biophys. Acta 1774, 16-34 (2007).

33. Whyte K. A. and Greenfield S. A.: Exp. Neurol. 184, 496-509 (2003).

34. Gordon R. K. et al.: Chem. Biol. Interact. 157-158, 239-246 (2005).

35. Wimo A., Winblad B. and Jönsson L.: Alzheim. Dem. 6, 98–103 (2010).

36. Zhao Q. and Tang X. C.: Eur. J. Pharm. 455, 101-107 (2002).

37. Husain K. and Somani S. M.: Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat. 22, 411- 423 (1998).

38. Dworacek B. and Rupreht J.: Inter. Cong. Sci. 1242, 87-93 (2002).

39. Wang B. et al.: Eur. J. Med. Chem. 45, 1415-1423 (2010).

40. Viegas C. et al.: Bioorg. Med. Chem. 13, 4184-4190 (2005).

41. Pagliosa L. B. et al.: Phytomedicine 17, 698-701 (2010).

42. Halldorsdottir E. S., Jaroszewski J. W. and Olafsdottir E. S.: Phytochemistry 71, 149-157 (2010).

43. Pan L. et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 3790-3793 (2008).

44. Tang H. et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 3765-3768 (2007).

45. Huang L. et al.: Bioorg. Med. Chem. 18, 1244-1251 (2010).

46. Shen Q. et al.: Eur. J. Med. Chem. 40, 1307-1315 (2005).

47. Sheng R. et al.: Bioorg. Med. Chem. 17, 6692-6698 (2009).

48. Otoguro K., Kuno F. and Omura S.: Pharmacol. Ther. 76, 45-54 (1997).

49. Schnutzner J., Šmat V. a kol.: Myasthenia gravis, Komplexní pojetí a chirurgická léčba, Galén, Praha 2005, s. 19, 22, 24-25, 79-82.

50. Herraiz T. and Chaparro C.: Life Sci. 78, 795-802 (2006).

51. Schwarz M. J. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav. 75, 627-633 (2003).

52. Roth J. a kol.: Parkinsonova nemoc, Maxdorf, Praha 2009, s. 17- 45.

53. Kim H., Sablin S. O. and Ramsay R. R.: Arch. Biochem. Biophys. 337, 137-142 (1997).

54. Pfau W. and Skog K.: J. Chromat. B 802, 115-126 (2004).

55. Chiarugi A. et al.: J. Leuk. Biol. 68, 260-266 (2000).

56. Castro A. C. et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 2419-2422 (2003).

57. Pramod R. S.: Pharmacol. Ther. 66, 339-368 (1995).

58. Ariano M. A. et al.: Brain Res. 752, 26-34 (1997).

59. Kűfferle B. et al: Psych. Res.: Neuroimaging section 68, 23-30 (1996).

60. Abdel-Fattah M. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav. 52, 421-426 (1995).

61. Kaňkovská K.: Základy farmakologie v akutní medicíně, Oddělení akutního příjmu FN Olomouc internet:http://public.fnol.cz/www/urgent/seminare/20071024/FARM.pdf) (3.8.2010)

62. Sarro G. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav. 58, 281-289 (1997).

63. Anand A., Saraf M. K. and Prabhakar S.: Behav. Brain Res. 182, 12-20 (2007).

64. Piletz J., Baker R. and Halaris A.: J. Psychol. Res. 42, 41-49 (2008).

65. García-Sevilla J. A. et al.: Neurosci. Lett. 247, 95-98 (1998).

66. Aricioglu-Kartal F., Kayir H. and Uzbay I. T.: Life Sci. 73, 2363-2371 (2003).

67. Husbands S. M. et al.: Drug and Alcohol Depend. 64, 203-208 (2001).

68. Cappendijk S. L. T., Fekkes D. and Dzoljic M. R.: Behav. Brain Res. 65, 117-119 (1994).

69. Mukherjee P. K. et al.: J. Ethnopharmacol. 106, 1-28 (2006).

70. Meldrum B. S., Akbar M. T. and Chapman A. G.: Epilepsy Res. 36, 189-204 (1999).

71. Moura D. J. et al.: Life Sci. 79, 2099-2104 (2006).

72. Tse S. Y. H. et al.: Biochem. Pharmacol. 42, 459-464 (1991).

73. Cao R. et al.: Eur. J. Med. Chem. 40, 991-1001 (2005).

74. Ishida J. et al.: Bioorg. Medicinal Chem. Lett. 9, 3319-3324 (1999).

75. Umezava K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 928-930 (1978).

76. Meester C.: Mutat. Res. 339, 139-153 (1995).

77. Sasaki Y. F. et al.: Mutat. Res. 302, 165-171 (1993).

78. Song Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 317, 128-132 (2004).

79. Shi C. C. et al.: Eur. J. Pharm. 390, 319-325 (2000).

80. Berrougui H. et al.: Pharmacol. Res. 54, 150-157 (2006).

81. Kiihn-Velten N.: Eur. J. Pharmacol. 250, R1-R3 (1993).

82. Waki H. et al.:Cell Metabol. 5, 357-370 (2007).

83. Fortunato J. J. et al.: Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biolog. Psych. 33, 1425-1430 (2009).

84. Bringmann G.: Eur. J. Pharmaceut. Sci. 28, 412-422 (2006).

85. Cao R. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1557-1563 (2005).

86. Dewick P. M.: Medicinal Natural Products: A Biosyntetic Approach, J. Wiley and Sons Ltd., Chichester 1997, s. 323-324.

87. Herraiz T.: J. Chromat. A, 881, 483-499 (2000).

88. Ledvina M.: Biochemie, Gaudeamus, Hradec Králové 1998, s. 16-29.

89. Kolektiv autorů: Biochemie základní kurz, Nakladatelství Karolínum, Praha 2005, s. 49-56.

90. Skup M., Oderfeld-Nowak B. and Rommelspacher H.: J. Neurochem. 41, 62-68 (1983).

91. Žďárová-Karasová J. a kol.: Chem. Listy 104, 46-50 (2010).

92. Martson A., Kissling J. and Hostettmann K.: Phytochem. Anal. 13, 51-54 (2002).

93. Rhee I. K. et al.: J. Chromatography A 915, 217-223 (2001).

94.http://hydro.chmi.cz/isarrow/object.php?seq=2000842586&chemie=1&bio ta=1&ukol_p=1&objekty_biodata=1&taxon=Fontinalis%20antipyretica (3. 8. 2010).

95.http://hydro.chmi.cz/isarrow/object.php?seq=2000842587&chemie=1&bio ta=1&ukol_p=1&objekty_biodata=1&taxon=Fontinalis%20antipyretica (3. 8. 2010).

96.http://hydro.chmi.cz/isarrow/object.php?seq=2000842849&chemie=1&bio ta=1&ukol_p=1&objekty_biodata=1&taxon=Fontinalis antipyretica (3. 8. 2010).

97. Kolektiv autorů: Český lékopis 2009, Grada Publishing a.s., Praha 2009, s. 114, 174, 310.

98. Kolektiv autorů: Československý lékopis 2, Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1954, s. 676-677.

99. Luis E. D. et al.: Neurotoxicology 29, 294-300 (2008).

100. Kolektiv autorů: European Pharmacopoeia 4th Edition, EDQM, Strasburg 2002.

101. Kolektiv autorů: ČSN ISO 3534-1, Statistika - slovník a značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994, s. 4.

102. Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1, 6 (1994).

103. Kolektiv autorů: Fed. Reg. 62 (96), 27463 (1997).

104. Nino J. et al.: Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101, 783-785 (2006).

105. Darvesh S. et al.: Clin. Biochem. 37, 42-49 (2004).

106.http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/c2888dat.Par.0001.File.tmp/c2888dat.pdf (3. 8. 2010).

107.http://www.interchim.com/interchim/bio/produits_uptima/tech_sheet/FT-UP01566(DTNB).pdf (3.8.2010).

108. Kolektiv autorů: Československý lékopis 4, Avicenum, Praha 1987, s. 360, 370.

109. Reisenauer R.: Metody matematické statistiky, SNTL, Praha 1970, s. 31.

110. Eyer P. et al.: Anal. Biochem. 312, 224-227 (2003).

111.

http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=149 (6.11.2010)

112.

http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=700 (6.11.2010).

113. Orhan I. et al.: J. Ethnopharmacol. 91, 57-60 (2004).

114. Ma X. and Gang D. R.: Nat. Prod. Rep. 21, 752-772 (2004).

115. Giovanni S. et al.: Eur. J. Pharmacol. Sci. 33, 109-119 (2008).

116. Lima M. M. C. et al: Planta Med. 75, 1-2 (2009).

11. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH A VĚDECKÝCH PRACÍ

1. Kršková Z., Martin J., Peč J., Dušek J.: Effects of Mg-ATP on the flavonoid production in the *Scutellaria baicalensis* Georgii suspension cultures, Čes. Slov. Farm. 57, 111-114 (2008).

2. Peč J., Riendigerová E., Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Therapeutic potential of phytocannabinoids and synthetic derivatives affecting human endocannabinoid system, Čes. Slov. Farm. 57, 195-207 (2008).

3. Ferreres F., Kršková Z., Gonçalves R. F., Valentão P., Pereira J. A., Dušek J., Martin J. and Andrade P. B.: Free Water-Soluble Phenolics Profiling in Barley (*Hordeum vulgare L.*), J. Agric. Food Chem. 57, 2405–2409 (2009).

4. Martin J., Kršková Z. a Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby, Praktické lékárenství (v tisku)

12. SOUHRN

Tato dizertační práce se zabývá testováním inhibiční aktivity methanolového a acetonového extraktu z vodního mechu *Fontinalis antipyretica (Fontinalaceae)* a β-karbolínových alkaloidů na aktivitu enzymů acetylcholinesterasy (ACHE) a butyrylcholinesterasy (BUCHE) s použitím „Fast Blue B salt“ testu na TLC desce a Ellmanova testu provedeném na spektrofotometru. Také bylo zkoumáno, jak dimethylsulfoxid (DMSO), který byl použit ve směsi s vodou jako rozpouštědlo, ovlivňuje aktivitu enzymů a alkaloidů. Další součástí práce bylo zjistit, ve kterých lokalitách se vodní mech vyskytuje, jaké obsahuje β-karbolínové alkaloidy a v jakém množství se tyto alkaloidy v mechu nachází. K tomuto hodnocení byla použita HPLC analýza. Z výsledků vyplývá, že z extraktů má vyšší inhibiční aktivitu na ACHE i BUCHE acetonový extrakt, přičemž nejvyšší aktivitu vykazuje acetonový extrakt na BUCHE. Nejvyšší inhibiční aktivitu na ACHE má s použitím eserinu jako referenční látky harmin ve formě báze i soli, a to jak v prostředí vodném, tak i ve směsi DMSO s vodou. Nejvyšší inhibiční aktivitu na BUCHE vykazuje ve vodném prostředí harmalol ve formě soli, ve směsi DMSO s vodou je nejaktivnější harmin ve formě báze i soli. Ukázalo se, že DMSO značně ovlivňuje nejen aktivitu enzymů, ale také alkaloidů.

Klíčová slova: *Fontinalis antipyretica*, β-karbolínové alkaloidy, ACHE, BUCHE, inhibitory ACHE a BUCHE, DMSO, Ellmanův test, test „Fast Blue B salt“

SUMMARY

This thesis deals with testing of inhibition activity of methanolic and acetonic extracts from water moss *Fontinalis antipyretica (Fontinalaceae)* and β-carboline alkaloids on activity of enzymes acetylcholinesterase (ACHE) and butyrylcholinesterase (BUCHE) using test „Fast Blue B salt“ at TLC desk and Ellman´s test using spectrophotometer. It was also investigated how dimethylsulfoxide used as a solvent in combination with water affects activity of enzymes and alkaloids. Another part of this work is focused on discovering in which locality water moss occures and what kind and quantity of β-carboline alkaloids contains. For this evaluation was applicated HPLC analysis. Results show that better inhibition activity of extracts on ACHE and BUCHE has acetonic extract whereas the hightest activity show acetonic extract on BUCHE. Harmine in form of base and salt in water and in mixture of DMSO and water has the hightest inhibition activity on ACHE using eserine as reference substance. Harmalol in form of salt in water and harmine in form of base and salt in mixture of DMSO and water has the hightest activity on BUCHE. It was find out that DMSO considerably affects activity of enzymes and alkaloids.

Keywords: *Fontinalis antipyretica*, β-carboline alkaloids, ACHE, BUCHE, inhibitors of ACHE and BUCHE, DMSO, Ellman´s test, test „Fast Blue B salt“