

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Přírodní látky a jejich biologická aktivita X. Screening vybraných alkaloidů  
na inhibici prolyloligopeptidasy**

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

Vedoucí školitel: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, duben 2015

Mgr. Lucie Ibrmajerová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

RIGOROUS THESIS

**Natural compounds and their biological activity X. Screening of selected  
alkaloids on inhibition of prolyloligopeptidase**

Head of department: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Supervisor: Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, april 2015

Mgr. Lucie Ibrmajerová

## PROHLÁŠENÍ

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

Tato práce byla finančně podpořena projektem specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260184).

Hradec Králové, duben 2015

jméno, příjmení

## PODĚKOVÁNÍ

Mé velké poděkování patří panu plk. doc. PharmDr. Danielu Junovi Ph.D. za umožnění měření aktivity alkaloidů na Fakultě vojenského zdravotnictví a podání odborných rad. Poděkování patří i paní Mgr. Martině Hrabinové, která mi pomáhala v laboratoři a panu Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za to, že se mě ujal jako vedoucí školitel, podával mi cenné rady a měl se mnou velkou trpělivost.

## OBSAH

OBSAH .....	5
I. ÚVOD.....	8
II. CÍL PRÁCE .....	11
III. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1. Neurodegenerativní choroby .....	12
3.1.1. Alzheimerova choroba .....	12
3.1.1.1. Etiologie .....	13
3.1.1.2. Epidemiologie.....	13
3.1.1.3. Patofyziologie .....	13
3.1.1.3.1. Cholinergní hypotéza .....	13
3.1.1.3.2. Senilní - amyloidové plaky, neurofibrilární spleti .....	15
3.1.1.3.3. Mitochondriální dysfunkce, oxidační stres .....	15
3.1.1.3.4. Neuronální zánět.....	16
3.1.1.3.5. Prolyloligopeptidasa .....	16
3.1.1.4. Terapie.....	17
3.1.1.4.1. Inhibitory cholinesteras .....	17
3.1.1.4.2. Inhibitory N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů .....	18
3.1.1.4.3. Inhibitory prolyloligopeptidasy .....	19
3.1.1.4.3.1. Syntetické inhibitory POP .....	19
3.1.1.4.3.2. Přírodní inhibitory POP .....	21
3.1.1.4.4. Nootropika .....	22
3.1.1.4.5. Ostatní léčiva.....	22
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1. Použité chemikálie .....	24
4.2. Seznam látek pro stanovení hodnot $IC_{50}$ .....	24
4.3. Příprava reagensí .....	39

4.3.1. Solný fosfátový pufr (SFP) .....	39
4.3.2. Roztok prolyloligopeptidasy (POP).....	39
4.3.3. Substrát 5 mM Z-Gly-Pro-p-nitroanilid.....	39
4.3.4. Příprava vzorků.....	39
4.4. Použité přístroje a pomůcky .....	40
4.5. Postupy měření.....	40
4.6. Zpracování naměřených dat .....	41
V. VÝSLEDKY .....	42
5.1. Výsledky naměřených a vypočítaných hodnot IC50 .....	42
VI. DISKUZE.....	43
VII. LITERATURA .....	47
VIII. ABSTRAKT .....	55
IX. ABSTRACT.....	56

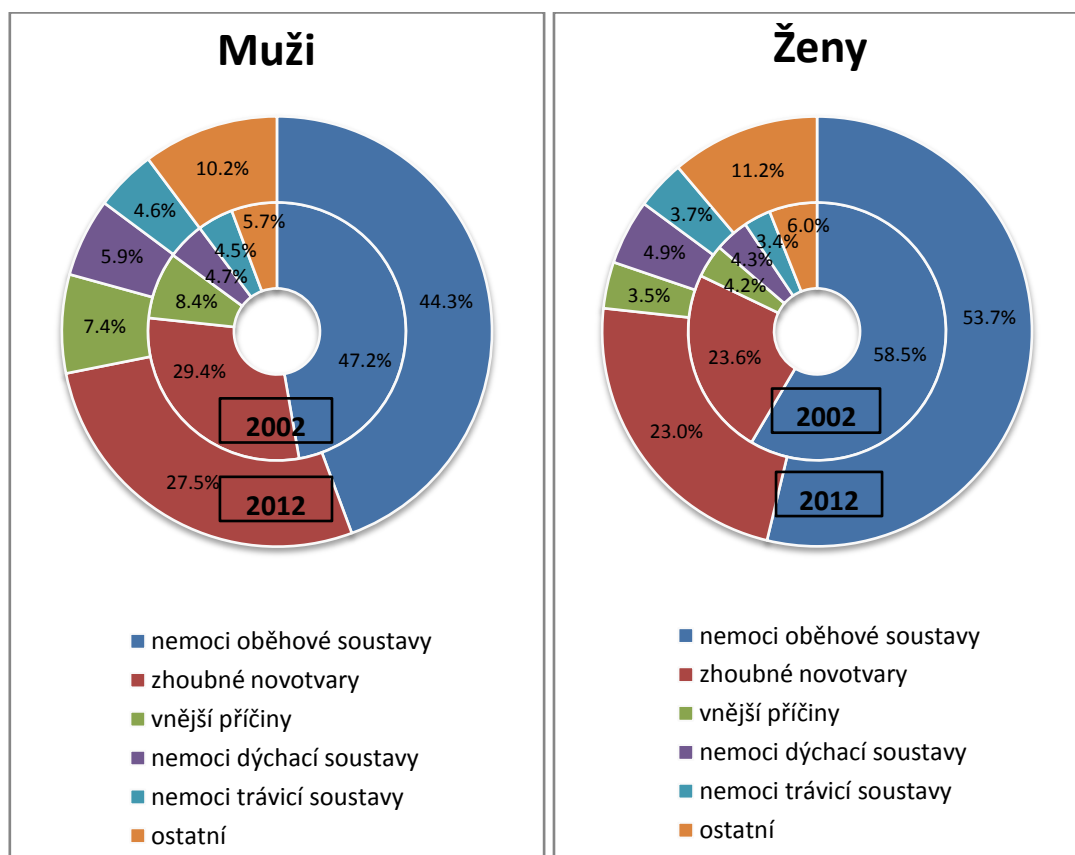
## SEZNAM ZKRATEK

<b>ACh</b>	acetylcholin
<b>AChE</b>	acetylcholinesterasa
<b>ACoA</b>	acetylkoenzym A
<b>AD</b>	Alzheimerova choroba
<b>APP</b>	amyloidní prekurzorový protein
<b>BChE</b>	butyrylcholinesterasa
<b>COX-2</b>	cyklooxygenasa 2
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>HEB</b>	hemoencefalická bariera
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartát
<b>NSAID</b>	nesteroidní antiflogistika
<b>POP, PPCE, PEP</b>	prolyl oligopeptidasa
<b>SFP</b>	solný fosfátový pufr
<b>USD</b>	americký dolar

## I. ÚVOD

Civilizační onemocnění provázejí lidstvo již odedávna. V posledních letech, i přes stále se zlepšující technologie, se výskyt některých nemocí zvyšuje. Je to dáno tím, že lidé jsou vystavováni velkému počtu rizikových faktorů. Tyto faktory je možno rozdělit do dvou základních skupin. Faktory vnější a faktory vnitřní. K vnějším faktorům patří např. kouření, strava, stres, sedavý způsob života, infekce atd. Tyto faktory jsou ovlivnitelné, je možno se jich vyvarovat a dodržovat jistá preventivní opatření. Faktory vnitřní – mezi ně se řadí genetické vlivy, u kterých jedinci mají ve své genetické výbavě přítomnou genetickou mutaci, kterou mohou dále předávat svým potomkům. Tyto faktory jsou neovlivnitelné.

Na prvním místě morbidity i mortality se řadí kardiovaskulární onemocnění, přičemž v ČR podle ÚZIS v roce 2012 činila úmrtnost celých 49 %. Mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí se řadí zhoubné novotvary, mortalita činila 25,3 %. Dalšími závažnými onemocněními jsou nemoci dýchací soustavy, gastrointestinální soustavy a v neposlední řadě i onemocnění nervové soustavy, které se řadí mezi ostatní nemoci. Vše je shrnuto v obr. 1<sup>1</sup>.



**Obr.1** Struktura zemřelých podle příčin v letech 2002 a 2012<sup>1</sup>



Z obrázku vyplývá, že i onemocnění nervové soustavy mají nemalý podíl na úmrtnosti. Mezi tyto onemocnění se řadí např. infekční zánětlivá onemocnění (meningitida, encefalitida), epilepsie, různé stavy po úrazech a v neposlední řadě i neurodegenerativní onemocnění.

Neurodegenerativní onemocnění mají společné znaky. Onemocnění mají progresivní průběh, jsou nevléčitelná a patologickými znaky jsou agregáty a inkluze tvořené specifickými proteiny. Mezi hlavní neurodegenerativní onemocnění patří Alzheimerova choroba, která zaujímá 60 – 70% všech případů demence, dále Parkinsonova choroba, Frontotemporální demence, Huntingtonova nemoc a další jiné formy demence<sup>2,3</sup>.

Na celém světě je 25 milionů lidí postižených demencí. Podle epidemiologických studií se odhaduje, že v roce 2030 se množství nemocných zdvojnásobí a v roce 2050 bude až 115 milionů pacientů trpících demencí. Incidence těchto případů v celém světě je ročně zhruba 5 milionů. Incidence neurodegenerativních chorob stoupá s věkem, ohroženi jsou tedy nejvíce senioři kolem 65 let, ovšem jsou i jisté případy, kdy nemoc propukne dříve.

Na celém světě byla prevalence demence u lidí nad 60 let odhadnuta na 3,9 %. Regionální prevalence je 1,6 % v Africe, 4,0 % v Číně a západním Tichomoří, 4,6 % v Latinské Americe, 5,4 % v západní Evropě, a 6,4 % v Severní Americe. Prevalence demence nad 70 let v Evropě je 6,4 %, pro Alzheimerovu nemoc (AD) je to 4,4 %. V USA ve věku nad 70 let je AD 9,7 %. Lidé, trpící určitou formou demence mají vysoké finanční nároky na zdravotnický a sociální systém. V roce 2010 byly celosvětové celkové náklady odhadnuty na 604 miliard USD<sup>4,5,6</sup>.

Stále probíhají klinické studie vedoucí ke zjištění výskytu forem demence. Např. ve studii, která probíhala v Austrálii, byli vybráni muži a ženy ve věku od 60 let. 336 těchto účastníků se podrobilo průřezové studii. Účastníci se rozhovorů a testů určujícím kognitivní funkce. Z výsledků vyplynulo, že Australané trpí Alzheimerovou nemocí v mladším věku<sup>7</sup>.

Etiologie Alzheimerovy choroby ještě není plně objasněna, a proto je léčba jen symptomatická. U této choroby dochází k ovlivnění kognitivních funkcí – zhoršení paměti, potíže s řečí, ke změně osobnosti a chování, problémům s orientací jak v čase, tak i prostoru, problémům s chůzí, atd. Léčba se tedy týká ovlivňování kognitivních funkcí, kdy se léčí jen projevy nemoci, zlepšuje se pacientova kvalita života a zpomaluje se průběh nemoci.

Portfolio léčiv Alzheimerovy choroby je poměrně úzké a minimálně polovinu reálných léčiv tvoří látky přírodního původu (galanthamin, huperzin A). Přírodní látky se proto staly vyhledávanou skupinou sloučenin, kterým je věnována velká pozornost především jako potenciálním kognitivům. Ve světě je několik pracovních skupin, které sledují neuroprotektivní účinky především alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae. Existují však další isochinolinové alkaloidy – např. z čeledí Papaveraceae a Fumariaceae, které vykazují rovněž zajímavou potenciální anticholinesterasovou aktivitu. Pracovní skupina v ČR, která se těmito látkami zabývá, je ADINACO Research Group z Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

## II. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo:

- 1) provedení rešerše na téma vlivu prolyloligopeptidasy v procesu Alzheimerovy choroby,
- 2) zjištění přírodních látek, kterým byla a je věnována pozornost z uvedeného hlediska,
- 3) změření  $IC_{50}$  u 40 alkaloidů izolovaných z různých rostlin a také komerčních, které byly poskytnuty pro tento účel pracovní skupinou ADINACO,
- 4) vyhodnocení výsledků,
- 5) sepsání rigorózní práce.

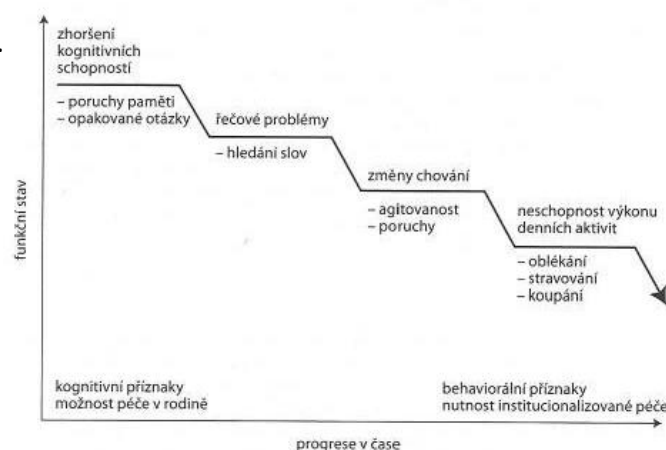
### III. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Neurodegenerativní choroby

Neurodegenerativní onemocnění je souhrnné označení pro choroby mozku, periferních nervů a míchy. I přesto, že se poškození týká různých částí nervové soustavy, jsou pro neurodegenerativní choroby typické určité znaky. Jedním z těchto znaků je progresivní průběh choroby, úbytek specifických skupin neuronů (v důsledku toho dochází k závažným neurologickým a psychickým příznakům), tvorba shluků, které jsou tvořeny patologicky změněnými proteiny. V neposlední řadě je třeba zmínit nevléčitelnost těchto onemocnění. Mezi neurodegenerativní onemocnění patří např. Parkinsonova nemoc, Huntingtonova nemoc, systémová atrofie ale především Alzheimerova choroba.

##### 3.1.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které je nejčastější příčinou demence. Tato choroba končí smrtí jedince během 6 – 10 let od propuknutí nemoci (záleží také na progresi onemocnění). K poškození a nevratnému zániku nervových buněk dochází především v mozkové kůře. Dále dochází k úbytku acetylcholinu (ACh), který je zodpovědný za přenos nervových vzruchů. V důsledku úbytku ACh dochází ke ztrátě kognitivních funkcí – poruchy převážně krátkodobé paměti, poruchy řeči, plynulosti a srozumitelnosti v mluvení. Nemocní neudrží pozornost, nejsou schopni se koncentrovat a jsou také velmi často desorientovaní (problémy s orientací jak v čase tak i prostoru). Dochází ke ztrátě osobnosti a není možné, aby se takto nemocný člověk dokázal sám o sebe postarat. Ztráta kognitivních funkcí patří k hlavním diagnostickým kritériím při stanovení Alzheimerovy choroby. Kognitivní poruchy doprovází i poruchy nekognitivní, kterým je třeba věnovat nemalou pozornost. Nemocní často trpí např. depresemi, zvýšeným krevním tlakem a bolestmi hlavy<sup>8,9</sup>.



**Obr. 2** Obvyklý průběh Alzheimerovy choroby v čase<sup>10</sup>

### **3.1.1.1. Etiologie**

Příčiny vzniku a rizikové faktory AD nejsou stále plně objasněny a zůstávají stále otázkou mnoha hypotéz. Odhadují se však rizikové faktory. Mezi potvrzené rizikové faktory patří věk a z části i genetický podklad, kdy na chromozomu 21 je uložen gen, který kóduje amyloidový prekurzorový protein (Amyloid Precursor Protein – APP). APP je protein, který je zodpovědný za ukládání patologického proteinu beta-amyloidu. Tyto změny na chromozomu se vyskytují u 5 – 20 % případů rané formy AD (nástup příznaků do 60. roku). Pro pozdní formu AD (první nástup příznaků po 60. roku) je hlavním rizikovým faktorem gen apolipoprotein E označovaný také jako lokus vnímavosti. Další rizikové faktory jsou např. různé úrazy hlavy, kouření, údajně nižší vzdělání, hliník, zinek a ženské pohlaví<sup>6,8,9</sup>.

Ženské pohlaví je zde zmiňováno proto, že v současné době probíhají studie zkoumající vliv estrogenu při AD. Je zde diskutován pokles estrogenu ve vztahu se zvýšeným rizikem AD vyskytujících se u žen<sup>11</sup>. Estrogen zlepšuje průtok krve (i v mozku), má protizánětlivé, antioxidantní účinky. Podporuje štěpení APP a zlepšuje kognitivní funkce. Důvodem zkoumání je i fakt, že ženy se dožívají vyššího věku, a proto je také větší pravděpodobnost onemocnět AD<sup>11,12,13</sup>.

### **3.1.1.2. Epidemiologie**

Odhad z roku 2010 přináší údaj velice znepokojující a to ten, že na celém světě je 25 milionů lidí, kteří trpí demencí, z toho 7,7 milionu onemocní ročně. Předpokládá se, že každých 20 let se počet nemocných zdvojnásobí<sup>4,5,14</sup>. Většina těchto nemocných se vyskytuje v zemích s nízkými a středními příjmy. Výskyt demence roste se zvyšujícím se věkem a nejvíce jsou postiženi pacienti nad 65 let<sup>8</sup>.

### **3.1.1.3. Patofyziologie**

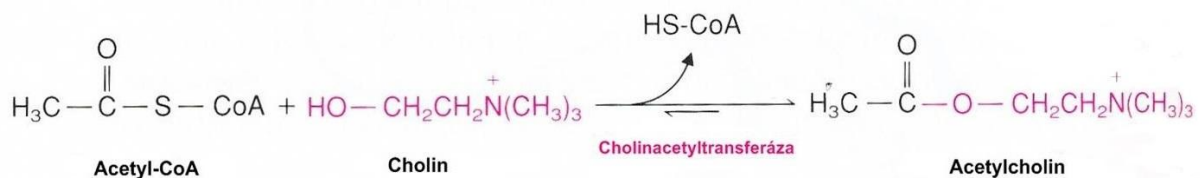
Přesná patofyziologie Alzheimerovy choroby není plně objasněna. Existují jen určité teorie, které mohou stát za vznikem tohoto onemocnění.

#### **3.1.1.3.1. Cholinergní hypotéza**

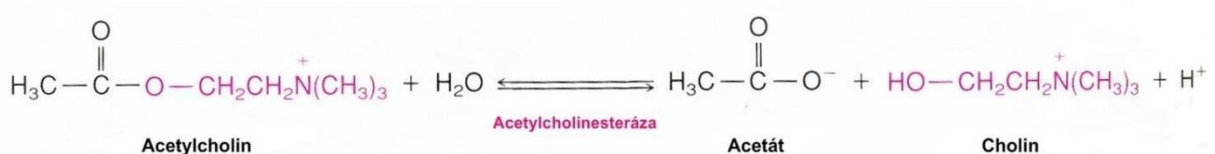
Syntéza ACh se děje následovně: v cytoplazmě neuronů z acetyl-koenzymu A (ACoA) a cholinu, prostřednictvím enzymu acetylcholintransferasy vznikne ACh (acetylcholin).

Takto vzniklý ACh je skladován ve vesikulách. K jeho uvolnění do synaptické štěrbině dochází podrážděním nervového zakončení akčním potenciálem, v zápětí se váže na receptory.

ACh je neurotransmitter, který se váže na dva typy receptorů. Na muskarinový receptor a na nikotinový receptor. Muskarinových receptorů je celkem pět podtypů a jsou exprimovány v různé míře v různých tkáních, včetně srdečního (M2) a hladkého svalstva (M3), sekrečních žláz, neuronů a gliových buněk v centrálním a periferním nervovém systému. Právě M1 receptory, které se nacházejí převážně v CNS (mozková kůra a periferní neurony) jsou pravděpodobně spojeny se vznikem demence. Jejich hlavní úloha je při uchování pozornosti, učení a paměti. Navázáním ACh na nikotinový receptor dochází k velmi rychlé reakci, kdy iontové kanály umožní zvýšení permeability pro Na a Ca<sup>15, 16, 17</sup>.



Po uvolnění ACh může dojít k jeho degradaci. ACh je rychle odbouráván pomocí enzymu acetylcholinesterasy (AChE), anebo v menší míře enzymu butyrylcholinestaresy (BuChE). Dojde tak k ukončení akčního potenciálu a snížení hladiny ACh. Porucha syntézy ACh vede ke ztrátě schopnosti učení, rozpadu paměti a může být příčinou duševních poruch a vzniku AD<sup>18</sup>.



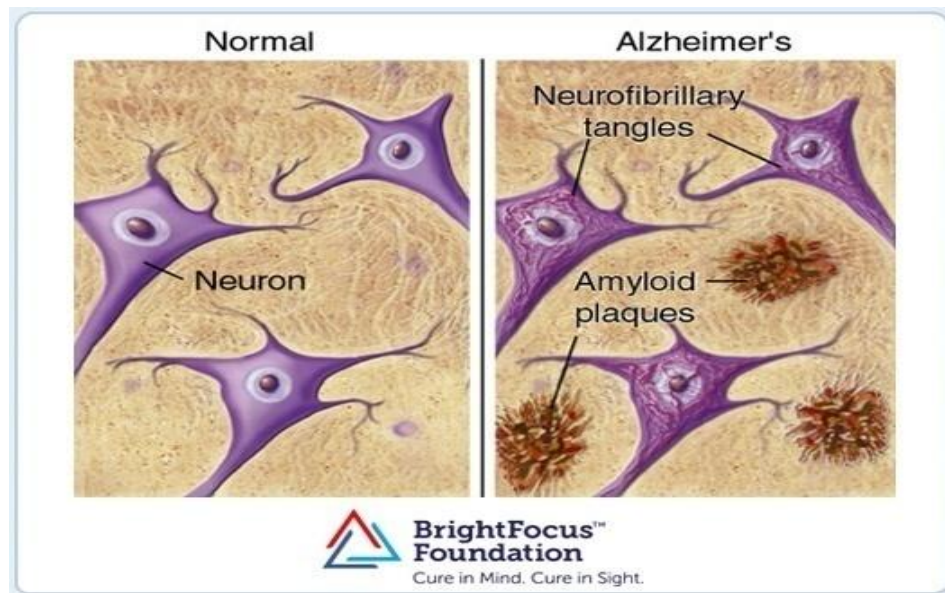
Na základě této skutečnosti dochází k cholinergnímu deficitu, tedy nedostatku ACh. Byly objeveny látky, které zabraňují tomuto procesu. Tyto látky se nazývají inhibitory AChE. Inhibitory enzymů AChE a také BuChE se používají jako léčiva při léčbě AD. Tyto látky zlepšují kognitivní funkce (viz farmakoterapie)<sup>19, 20, 21</sup>.

### 3.1.1.3.2. Senilní - amyloidové plaky, neurofibrilární spleti

Senilní plaky jsou útvary v mozku nemocných AD. Tyto útvary jsou složené z bílkoviny, tzv. amyloidu. Amyloid se v mnoha literaturách označuje také jako amyloidový  $\beta$ -protein. Tento protein vzniká proteolytických štěpením APP pomocí  $\beta$ -sekretázy a  $\gamma$ -sekretázy<sup>22,23</sup>.

Mohou se vyskytovat i neurofibrilární spleti (viz Obr. 3). Spleti jsou přímo v neuronech a jejich počet je tedy spojen se stupněm demence.

Spleti jsou složeny z  $\tau$ -proteinu. Tento protein je součástí mikrotubulů, které jsou zodpovědné za dopravování důležitých látek z jedné buňky do druhé. Při AD je funkce  $\tau$ -proteinu abnormální, a proto nedokážou mikrotubuly plnit svoji funkci<sup>24</sup>.



**Obr. 3** Amyloidní plaky a neurofibrilární spleti u zdravých pacientů a pacientů s AD<sup>25</sup>

### 3.1.1.3.3. Mitochondriální dysfunkce, oxidační stres

Hlavní role mitochondrií spočívá v bioenergetických procesech v buňce (např. dýchací řetězec, Krebsův cyklus,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a apoptické procesy v buňce). Při jakékoli mutaci v mitochondriální DNA by mohlo dojít k tomu, že tyto energetické procesy selžou, zvýší se oxidační stres a bude se hromadit  $\beta$ -amyloid. Mitochondriální dysfunkce se zhoršuje s narůstajícím věkem<sup>26,27,28</sup>.

#### **3.1.1.3.4. Neuronální zánět**

Přesná patofyziologie neuronálního zánětu není zcela objasněna, ale je zcela jasné, že chronické zánětlivé procesy hrají roli v progresi neuropatologických změn AD<sup>29</sup>.

Podměty vedoucí k neuronálnímu zánětu mohou být neurofibrilární spleti a  $\beta$ -amyloid, které mohou způsobovat zánětlivou odpověď<sup>30</sup>.

Podle epidemiologických studií u osob mezi 65. – 75. rokem užívajících NSAID se zkoumá ochranný účinek před AD. U některých pacientů se oddálil nástup a zpomalila se progresse AD. Nejlepší profylaktický účinek vykazují inhibitory COX-2 (celecoxib, rofecoxib)<sup>31</sup>. Je třeba ovšem zvážit riziko nežádoucích účinků NSAID.

#### **3.1.1.3.5. Prolyloloigopeptidasa**

Prolyloloigopeptidasa patří do skupiny serinových proteas. Proteasy jsou enzymy, které hydrolyzují peptidové vazby aminokyselin. Proteasy můžeme rozdělit na exopeptidasy a endopeptidasy. Exopeptidázy odštěpují aminokyseliny od konce peptidového řetězce a to buď na N anebo C konci. Endopeptidasy štěpí uvnitř peptidového řetězce<sup>32</sup>.

Původní název tohoto enzymu byl PPCE (post-proline clearing enzyme). Později byl tento název změněn na PEP (prolylendopeptidase) a v roce 1992 na POP (prolyloloigopeptidase)<sup>33</sup>.

U lidí, krav a prasat se skládá tento enzym ze 710 aminokyselin a jeho velikost je cca 80 kDa<sup>34,35</sup>. Aktivita POP byla hodnocena v lidském a potkaním mozku. Bylo zjištěno, že aktivita enzymu je vyšší u člověka, a to v největší míře v mozkové kůře a nejnižší v mozečku. U potkana byl výskyt POP rovnoměrně rozptýlen po celém mozku<sup>36</sup>.

POP se nachází, jak již bylo zmíněno ve vysoké koncentraci v mozku. Také se objevují zmínky o tom, že se vyskytuje např. i v játrech, ledvinách<sup>37,38</sup>. Existují důkazy o tom, že tento enzym zasahuje do metabolismu substance P (nízké hladiny se vyskytují v mozku pacientů s AD), vasopresinu, thyreoliberinu a gonadoliberinu<sup>39,40</sup>.

POP je zapojena do mnoha fyziologických procesů, jako je např. učení, paměť a vzniku psychiatrických onemocnění. POP se také zřejmě podílí na ukládání  $\beta$ -amyloidu v mozku. Díky těmto skutečnostem je snaha nalézt inhibitory tohoto enzymu a pomocí těchto inhibitorů POP zamezit ukládání  $\beta$ -amyloidu a zlepšit tak kognitivní funkce.



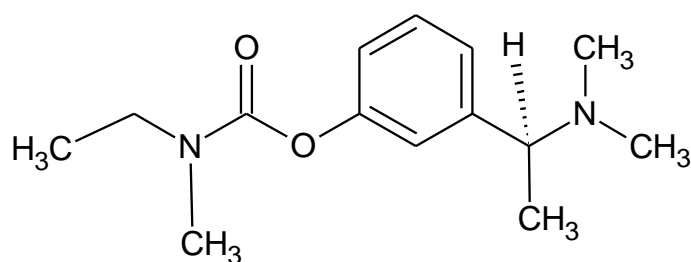
### 3.1.1.4. Terapie

#### 3.1.1.4.1. Inhibitory cholinesteras

Na základě cholinergní hypotézy byly do praxe v léčbě mírné až středně závažné AD zavedeny tzv. inhibitory cholinesterasy. Inhibitory cholinesterasy jsou látky, jejichž mechanismem účinku je blokování enzymu AChE nebo BuChE (rivastigmin). Dochází tedy ke zvýšení ACh uvolněného z presynaptických štěrbin<sup>41,42</sup>. Hlavním přínosem těchto látek je zlepšení kognitivních funkcí. Mezi nejvýznamnější látky spadající do této skupiny patří syntetické látky rivastigmin, donepezil a přírodní látka galanthamin.

#### Rivastigmin

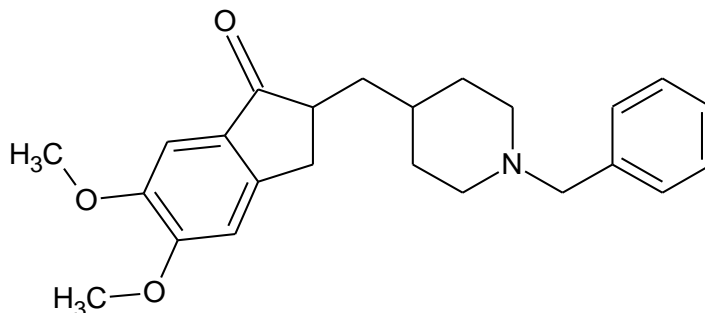
Rivastigmin je selektivní inhibitor odvozený od kyseliny karbamové. Molekula je lipofilní, a proto látka proniká dobře do mozku. Působí v oblastech mozku, které jsou nejvíce postižené AD, a to je hippokampus a mozková kůra. Inhibuje jak AChE, tak i BuChE. Nežádoucí účinky po užití mohou být nechutenství, nauzea, dyspepsie a průjmy. Tyto nežádoucí účinky lze minimalizovat podáním menšího množství látky<sup>43</sup>. Podává se *per os* (schváleno v roce 2000) anebo transdermálně (schváleno v roce 2007)<sup>44</sup>. Zkoumá se také intranasální podání<sup>45</sup>.



Obr. 4 Struktura rivastigminu

## Donepezil

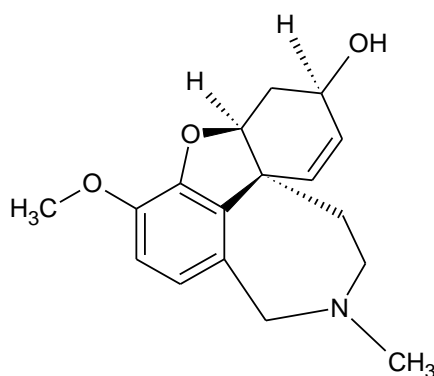
Piperidinový derivát s reverzibilní acetylcholinesterasovou aktivitou. Žádné závažné nežádoucí účinky po podání léku nejsou známy.



**Obr. 5** Struktura donepezilu

## Galanthamin

Galanthamin je izolován z *Galanthus woronowii* patřící do čeledi Amaryllidaceae. Tato látka byla objevena náhodně na počátku roku 1950. Původně bylo použití této látky určeno k léčbě stavů po obrně. Dnes se řadí svým mechanismem účinku k selektivním reverzibilním inhibitorům AChE. Vykazuje cholinergní nežádoucí účinky <sup>46</sup>, např. bolest hlavy, rozmazané vidění, nevolnost, častější močení, zmatenost, pocení, atd. Tato látka je běžně klinicky používána.



**Obr. 6** Struktura galanthaminu

#### **3.1.1.4.2. Inhibitory N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů**

Postižení glutamatergního systému může vést k AD. Glutamát se nadměrně uvolňuje v hippocampu, mozkové kůře aj., dochází tak ke zpětnému vychytávání glutamátu a navázání na receptor NMDA (N-methyl-D-aspartátový receptor), což může vést k mnoha nežádoucím dějům (např. neuronální apoptóza). Zde je hlavní úloha inhibitorů NMDA <sup>47</sup>.

#### **Memantin**

Memantin je jediná látka řadící se do skupiny inhibitorů NMDA (receptory se podílejí na schopnosti učení a paměti). Tato látka se běžně používá při pokročilém stadiu AD. Memantin se dává v denní dávce 20 mg, avšak tato dávka je pro pacienta na začátku léčby vysoká a hrozí možné nežádoucí účinky (somnolescence, závratě, halucinace, zácpa, hypertenze, aj.). Proto je třeba riziko možných nežádoucích účinků snížit. To může být provedeno vhodnou kombinací s některými kognitivními, záleží však na závažnosti stavu pacienta <sup>48</sup>.

#### **3.1.1.4.3. Inhibitory prolyloligopeptidasy**

Účinky a vlastnosti POP jsou popsány v kapitole 3.1.1.3.5. POP, je pravděpodobně zapojena zatím přesně neznámým mechanismem do vzniku AD. Je proto snaha najít nové potenciální inhibitory POP. Jsou již známé inhibitory POP z řad přírodních látek, těmito látkami jsou berberin a baikalin. Syntetickým látkám se také věnuje nemalá pozornost.

##### **3.1.1.4.3.1. Syntetické inhibitory POP**

#### **Azabicyclo[2.2.2]oktan, Azabicyclo[2.2.2]heptan**

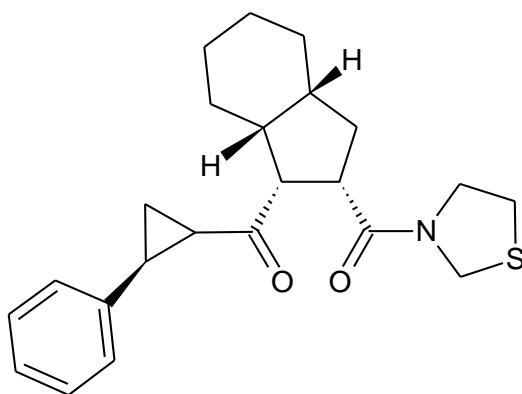
Tyto dvě molekuly se podrobují klinickým zkouškám ke zjištění aktivity jako inhibitoru POP <sup>49</sup>.

### ONO-1603

ONO-1603 je v současné době látka, které je věnována velká pozornost. Nemá neurotoxické účinky, je schopna se zapojit do apoptózy a má neuroprotektivní účinky<sup>50</sup>. Látka je schopná inhibovat POP a proto je zkoumána při léčbě AD<sup>51</sup>.

### S 17092

V současné době probíhají klinické studie na možné využití v inhibici mozkové POP. Na základě těchto studií vykazuje tato látka slibné účinky v léčbě kognitivních poruch, protože zpomaluje degradaci neuroaktivních peptidů<sup>52</sup>.



**Obr. 7** Struktura S17092

### SUAM-1221

Tato látka byla zkoumána jako možný inhibitor POP. Aktivita látky byla zkoumána v psím mozku<sup>53</sup> a dále v krysím a myším mozku a ledvinách. SUAM-1221 dobře pronikala do CNS, inhibice bylo dosaženo za 5-10 minut po i. p. podání<sup>54</sup>.

## JTP-4819, KYP-2047

Podle klinických studií, probíhajících na potkanech bylo zjištěno, že tyto látky mohou proniknout přes HEB a mohou tak inhibovat POP, což vede ke zlepšení paměti. V daných případech byly podávány v dávce 50  $\mu\text{mol/kg}$  <sup>55,56</sup>.

### 3.1.1.4.3.2. Přírodní inhibitory POP

#### Leukosesterterpenon, leukosesterlaktón

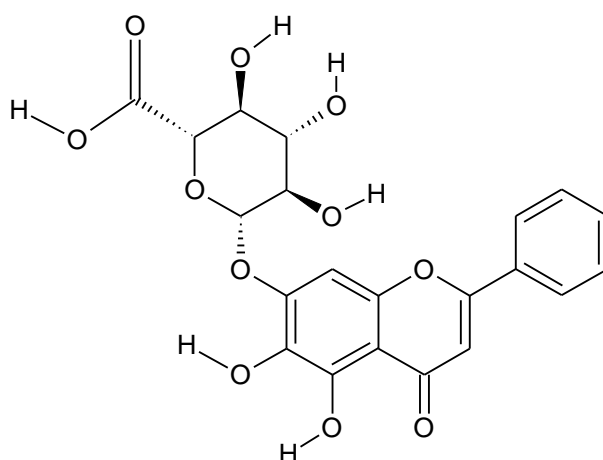
Seskviterpeny izolované z *Leucosceptrum canum* z Nepálu <sup>57</sup>.

#### Isotamarixin

Pentacyklický triterpenoid je izolovaný z nadzemní části rostliny *Tamarix hispida*. Vykazuje silné antioxidační účinky a významnou inhibiční aktivitu proti POP <sup>58</sup>.

#### Baikalin, Baikalein

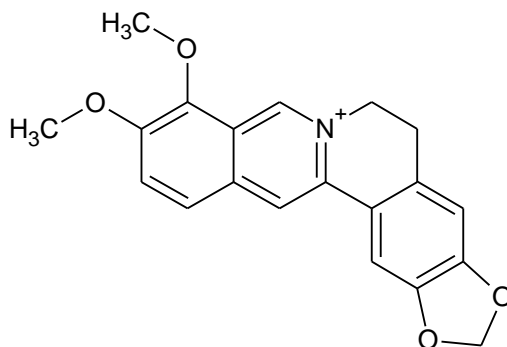
Baikalin je flavonoid, který byl izolovaný z kořenů *Scutellaria baicalensis*. Má protizánětlivé, antibakteriální, antioxidační a protinádorové účinky. Bylo zjištěno, že baikalin se v organismu přeměňuje na aglykon baikalein, který je schopný proniknout přes HEB. Baikalein inhibuje POP v závislosti na dávce. Studie dále přináší důkazy o tom, že baikalin má protektivní účinek proti otoku a ischemii mozku (ischemie může také zhoršovat proces učení a paměť) <sup>59,60</sup>.



**Obr. 8** Struktura baikalinu

## Berberin

Berberin je isochinolinový alkaloid izolovaný z *Coptis chinensis*, konkrétně z jeho oddenku. Účinek berberinu je závislý na dávce <sup>61</sup>. Tomuto alkaloidu je věnována velká pozornost, vykazuje totiž slibné výsledky u pacientů s neurodegenerativními a psychiatrickými poruchami <sup>62</sup>.



**Obr. 9** Struktura berberinu

### 3.1.1.4.4. Nootropika

Nootropika jsou látky, které nemají jednotnou chemickou strukturu. Mezi hlavní účinky nootropik jak u nemocných (nemocní po mozkové příhodě, úrazech hlavy, lehčích demencích, hypoxii aj.), tak zdravých pacientů, patří zlepšení dostupnosti kyslíku do mozku, zlepšení reologických vlastností krve. Dále ovlivňují paměť a učení pozitivním směrem. K těmto látkám patří např. **piracetam**, **pyritinol**, **lecitin**. Nootropika jsou spíše podpůrnou terapií u pacientů s AD, kdy zlepšují kognitivní funkce. Jejich nežádoucím účinkem může být nespavost <sup>10,20</sup>.

### 3.1.1.4.5. Ostatní léčiva

**Cerebrolysin** je peptid připravený enzymatickým štěpením proteinů z mozku prasat. Podporuje funkci nervových buněk, zpomaluje progresi onemocnění a zlepšuje kognitivní funkce. Podává se v infuzích <sup>47,48</sup>.

**Antioxidanty** jako vitamin E,  $\beta$ -karoten nemají prokázané žádné přímé klinické účinky na AD. Vykazují spíše preventivní účinek a podávají se jako doplňková léčba <sup>47</sup>.

Jak již bylo zmíněno, nemocní také trpí depresemi, nespavostí, zvýšeným krevním tlakem, aj., vzhledem k tomu jsou jako doplňková léčiva řazena u pacientů **antidepresiva**, **anxiolytika**, **hypnotika** a **antihypertenziva**.

## IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

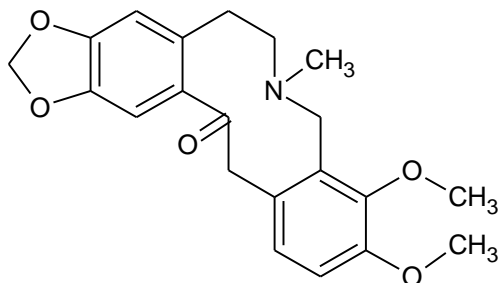
### 4.1. Použité chemikálie

- chlorid sodný, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- chlorid draselný, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- hydrogenfosforečnan dvojsodný, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- hydrogenfosforečnan dvojdraselný, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- kyselina chlorovodíková, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- deionizovaná voda, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- dimethylsulfoxid, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- 1,4- dioxan, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- prolyloligopeptidasa, Sigma-Aldrich, (Praha)
- albumin, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)
- Z-gly-pro-p-nitroanilid, p.a., Sigma-Aldrich, (Praha)

### 4.2. Seznam látek pro stanovení hodnot IC<sub>50</sub>

#### 1 Allokryptopin

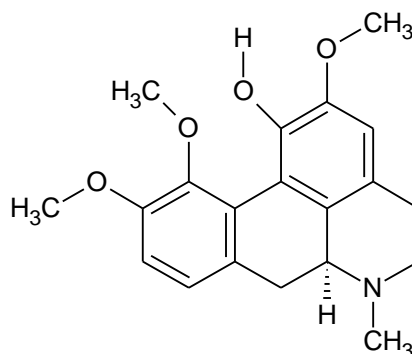
*Eschscholtzia californica* CHAM.  
(Papaveraceae)



M<sub>r</sub> 369,416

#### 2 (+)-Korydin

*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)

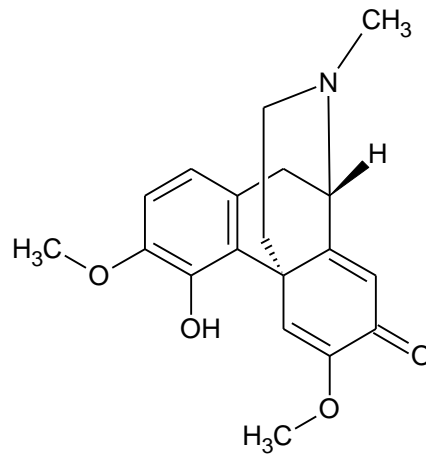


M<sub>r</sub> 341,406



**3 (-)-Sinoakutin**

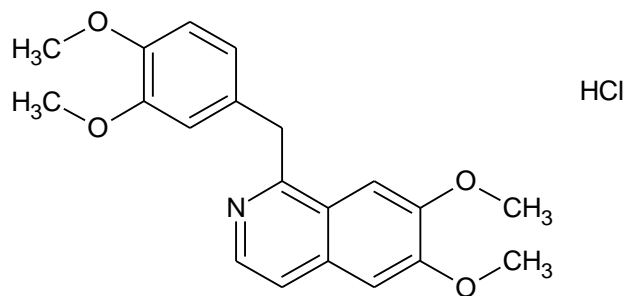
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 327,379

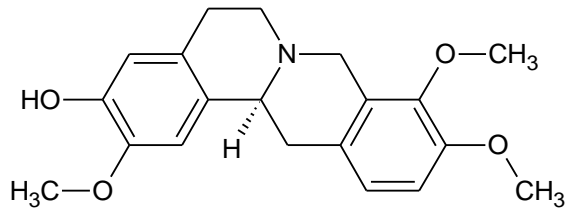
**4 Papaverinium chlorid**

*Papaver somniferum* L.  
(Papaveraceae)



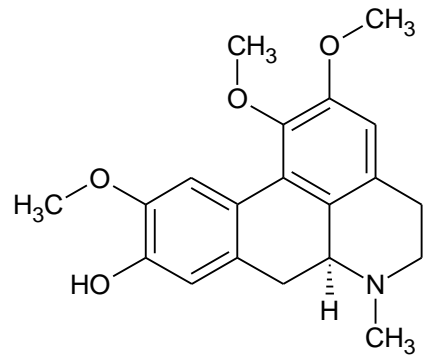
M<sub>r</sub> 375,850

- 5 (+)-Korypalmin**  
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
 (Fumariaceae)



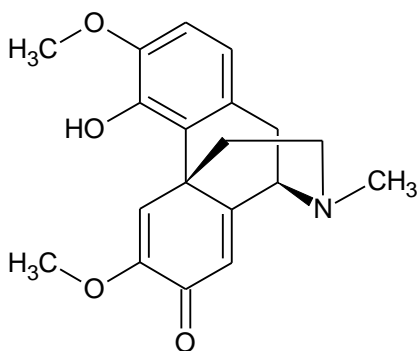
M<sub>r</sub> 341,406

- 6 (+)-N-Methylaurotetanin**  
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
 (Fumariaceae)



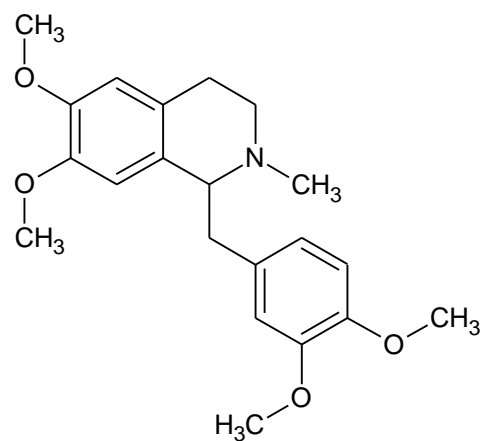
M<sub>r</sub> 341,406

- 7 Salutaridin**  
*Eschscholtzia californica* CHAM.  
 (Papaveraceae)



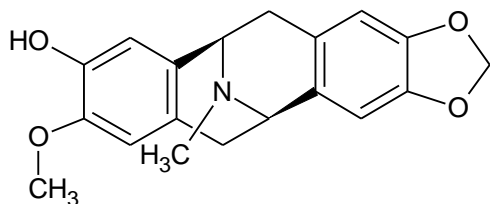
M<sub>r</sub> 327,379

- 8 Retikulin**  
*Eschscholtzia californica* CHAM.  
 (Papaveraceae)



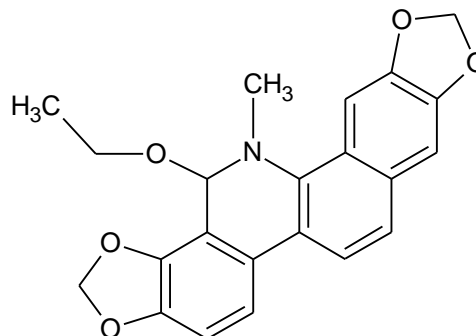
M<sub>r</sub> 329,395

**9 Karyachin**  
*Eschscholtzia californica* CHAM.  
(Papaveraceae)



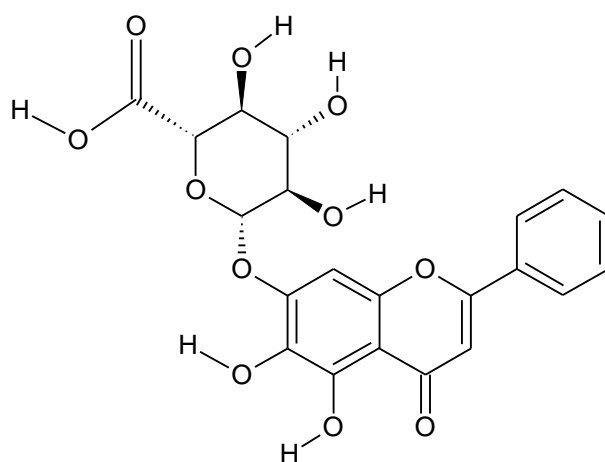
$M_r$  325,363

**10 6-Ethoxy-6-dihydrosanguinarin**  
*Chelidonium majus* L.  
(Papaveraceae)



$M_r$  377,396

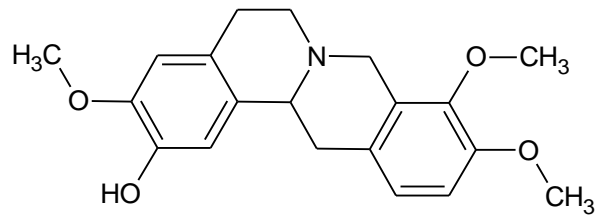
**11 Baikalin**  
(komerční)



$M_r$  446,361

**12 (-)-Isokorypalmin**

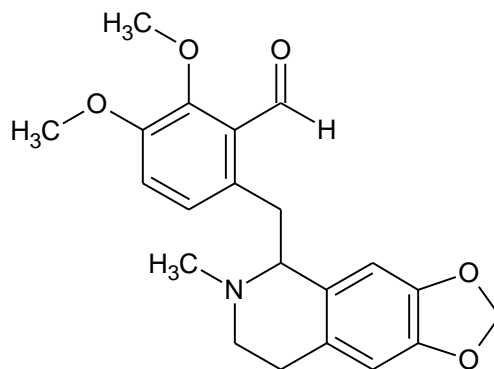
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 341,406

**13 (+)-Kanadalin**

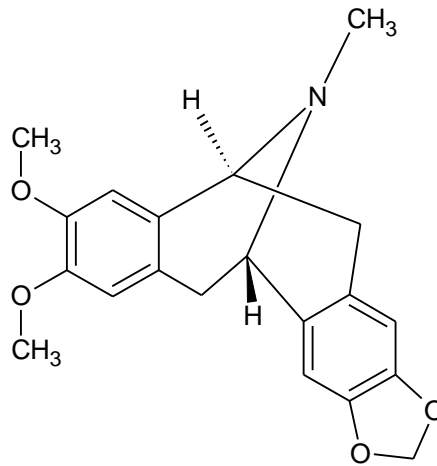
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 369,416

**14 O-Methylkaryachin**

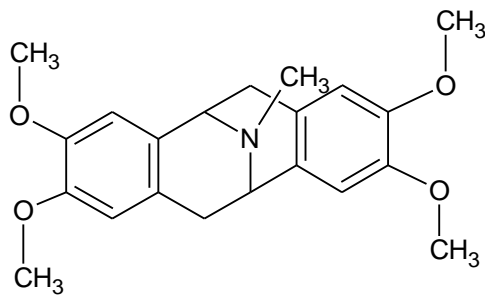
*Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae)



M<sub>r</sub> 325,364

**15 Argemonin**

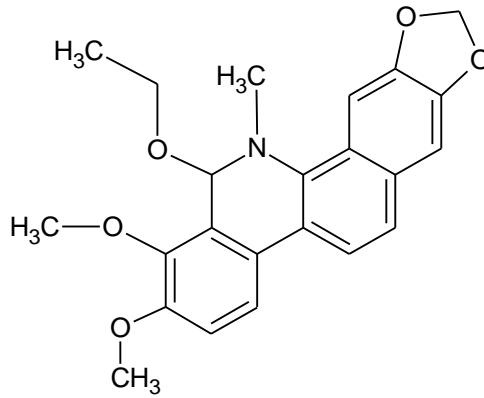
*Eschscholtzia californica* CHAM. (Papaveraceae)



M<sub>r</sub> 355,43

**16 6-Ethoxy-6-dihydrochelerythrin**

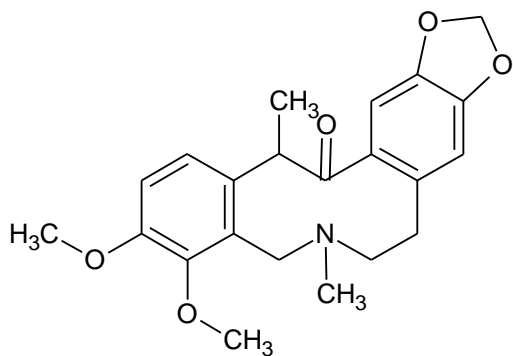
*Chelidonium majus* L.  
(Papaveraceae)



M<sub>r</sub> 365,385

**17 (±)-Korykavidin**

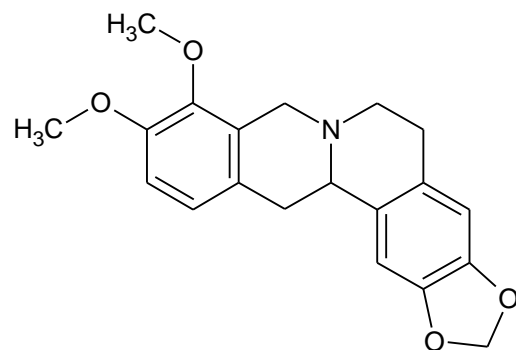
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 383,433

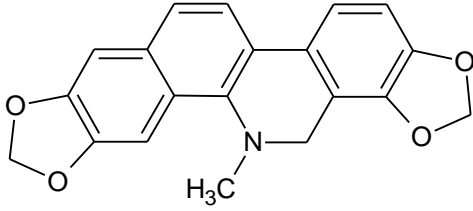
**18 (+)-Kanadin**

*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



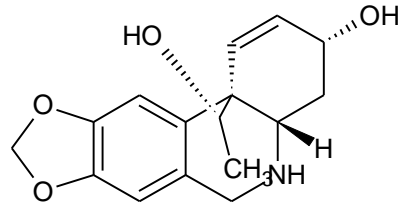
M<sub>r</sub> 339,390

- 19 Dihydrosanguinarin**  
*Chelidonium majus* L.  
 (Papaveraceae)



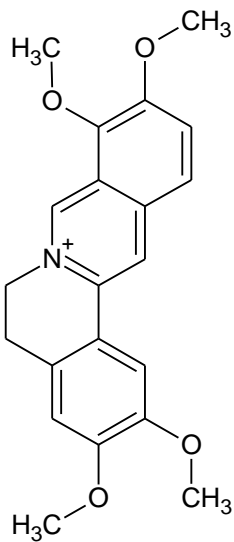
$M_r$  333,343

- 20 (+)-Hamayn**  
*Zephyranthes robusta* BAK.  
 (Amaryllidaceae)



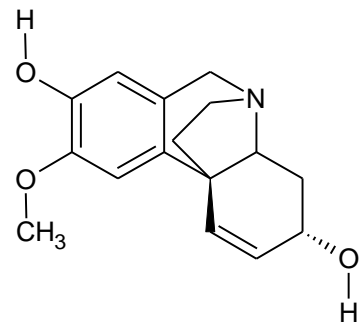
$M_r$  287,315

- 21 Palmatin chlorid**  
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
 (Fumariaceae)



$M_r$  405,862

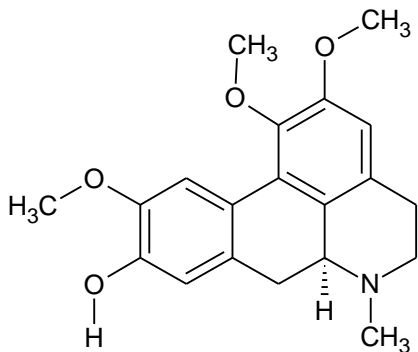
- 22 (-)-8-O-Demethylmaritidin**  
*Zephyranthes robusta* BAK.  
 (Amaryllidaceae)



$M_r$  273,331

**23 N-Methyllaurotetatin**

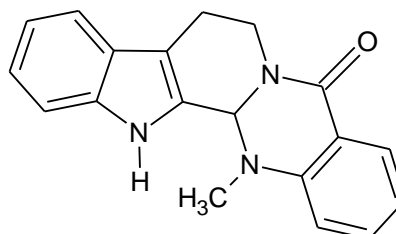
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 341,406

**24 Evodiamin**

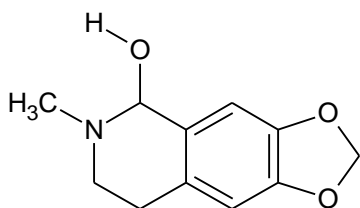
*Evodia rutaecarpa* (JUSS.) BENTH.  
(Rutaceae)



M<sub>r</sub> 303,363

**25 Hydrastinin hydrochlorid**

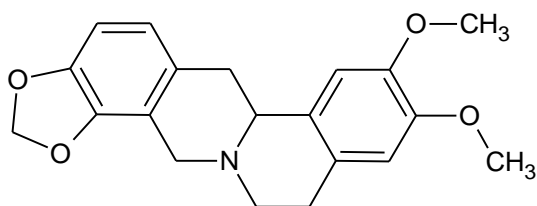
*Hydrastis canadensis* L.  
(Ranunculaceae)



M<sub>r</sub> 243,690

**26 (-)-Sinaktin**

*Fumaria officinalis* L.  
(Fumariaceae)

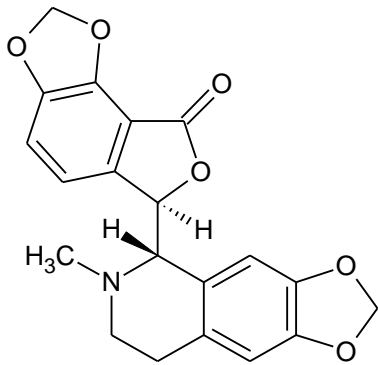


HCl

M<sub>r</sub> 339,390

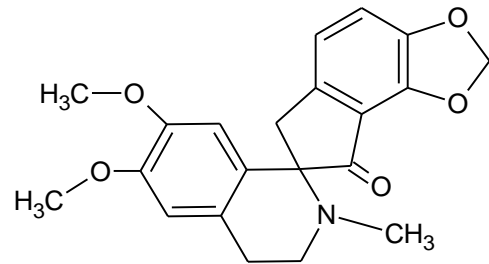


**27 (-)-Bikukulin**  
*Fumaria officinalis* L.  
(Fumariaceae)



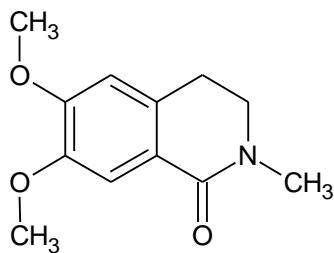
M<sub>r</sub> 367,357

**28 (+)-Parfumidin**  
*Fumaria officinalis* L.  
(Fumariaceae)



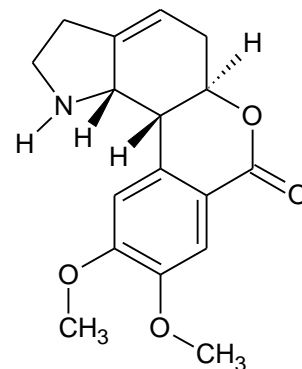
M<sub>r</sub> 367,401

**29 N-Methylkorydaldin**  
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 221,252

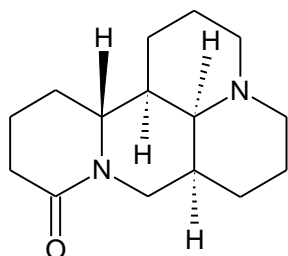
**30 Homolykorin**  
*Zephyranthes robusta* BAK.  
(Amaryllidaceae)



M<sub>r</sub> 315,363

**31 Matrin**

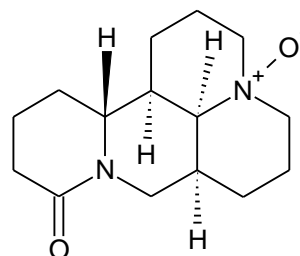
*Sophora flavescens* AIT.  
(Fabaceae)



M<sub>r</sub> 248,363

**32 Oxymatrin**

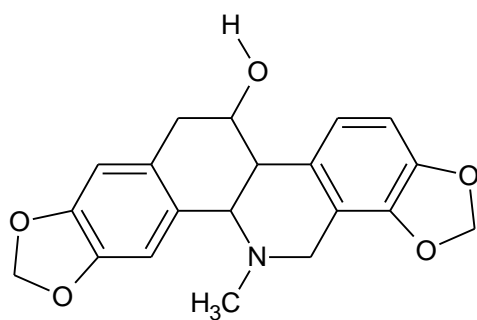
*Sophora flavescens* AIT.  
(Fabaceae)



M<sub>r</sub> 264,360

**33 Chelidonin**

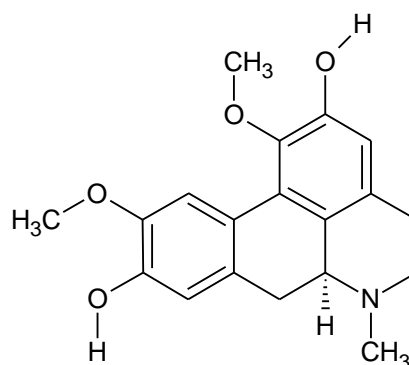
*Chelidonium majus* L.  
(Papaveraceae)



M<sub>r</sub> 353,368

**34 Boldin**

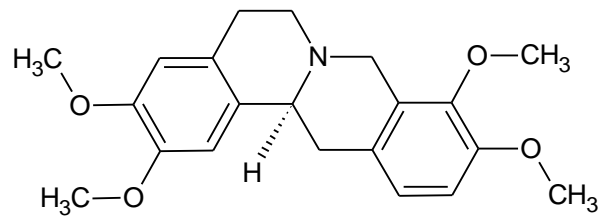
*Peumus boldus* MOLINA  
(Monimiaceae)



M<sub>r</sub> 327,370

**35 (+)-Tetrahydropalmatin**

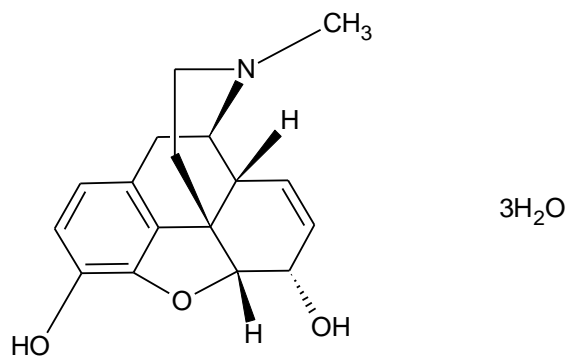
*Corydalis cava* (L.) SCHWEIGG. et KOERTE  
(Fumariaceae)



M<sub>r</sub> 355,428

**36 Morfinium chlorid trihydrát**

*Papaver somniferum* L.  
(Papaveraceae)

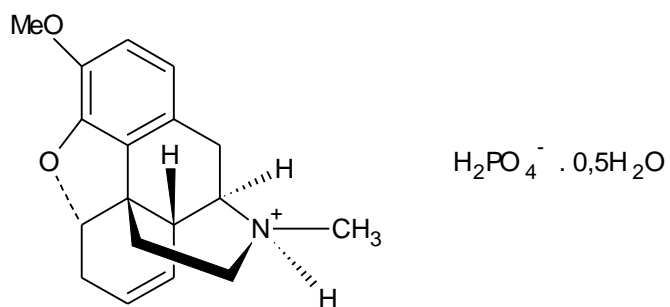


M<sub>r</sub> 375,850

**37 Kodeinium fosfát hemihidrát**

*Papaver somniferum* L.

(Papaveraceae)

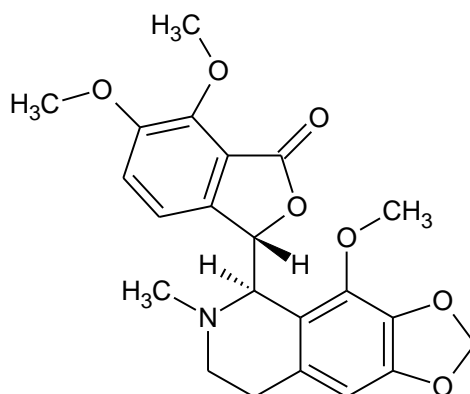


M<sub>r</sub> 406,370

**38 (S,R)-Noskapin**

*Papaver somniferum* L.

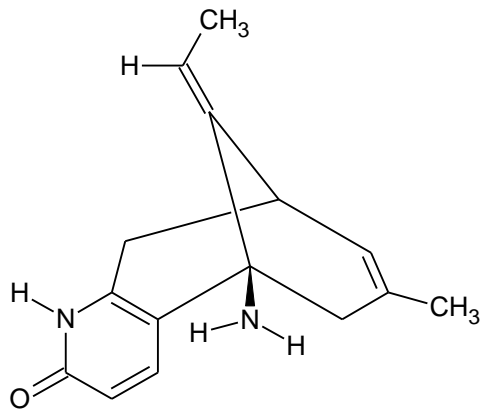
(Papaveraceae)



M<sub>r</sub> 413,421

**39 Huperzin A**

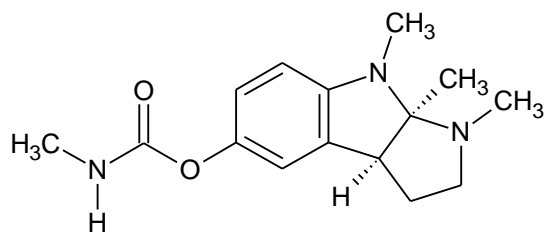
*Huperzia serrata* (THUNB. ex MURRAY) TREVIS.  
(Huperziaceae)



M<sub>r</sub> 242,320

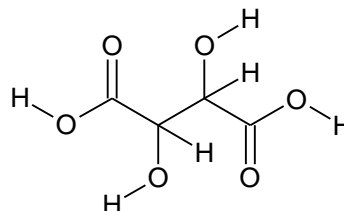
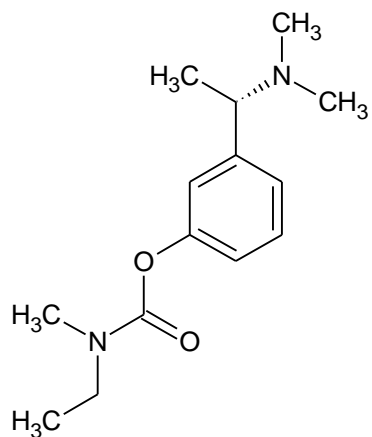
**40 Eserin**

*Physostigma venenosum* BALF.  
(Fabaceae)



M<sub>r</sub> 275,346

**41 Rivastigminium tartarát**  
(komerční)



M<sub>r</sub> 400,423

### 4.3. Příprava reagensí

#### 4.3.1. Solný fosfátový pufr (SFP)

- Při přípravě pufru bylo naváženo toto množství bezvodých solí: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KHPO<sub>4</sub> do 1 l kádinky. Poté bylo přidáno 950 ml H<sub>2</sub>O a změřeno pH roztoku, které bylo 7,4. Roztok byl převeden do 1l odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

#### 4.3.2. Roztok prolyloligopeptidasy (POP)

- Obsah lahvičky komerčně dostupného preparátu enzymu má výrobcem deklarovanou aktivitu  $\geq 200$  U (1 U enzymu dle specifikace přemění 1,0 pM/min substrátu Ala-Pro-aminomethylkumarinu při pH 7,4 a teplotě 25 °C). Enzym byl v lahvičce naředěn 100  $\mu$ l SFP s obsahem 0,1 % albuminu. Albumin byl přidán kvůli stabilizaci enzymu. Objem byl postupně doplněn za promíchávání až do celkového objemu 1 ml. Nespotřebovaný enzym byl z důvodu nízké stability uchováván při -70 °C. Při použití zamraženého enzymu byla vždy provedena kontrola aktivity a před vlastním měřením provedena úprava objemu s pomocí výše uvedeného pufru pro dosažení požadované aktivity.

#### 4.3.3. Substrát 5 mM Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid

- Roztok substrátu byl připraven navážením 8,520 mg Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu a rozpuštěním v 2 ml 1,4-dioxanu. Vždy bylo nutné změřit absorbanci roztoku (1,4-dioxan zvyšuje absorbanci) a porovnat ji s kontrolním vzorkem. Roztok byl vždy připraven čerstvý.

#### 4.3.4. Příprava vzorků

- Na základě hodnot  $M_r$  jednotlivých testovaných látek bylo vypočteno množství rozpouštědla (DMSO), které se má přidat pro přípravu zásobního roztoku. Podle rozpustnosti látky v DMSO byla jeho koncentrace  $10^{-3}$  M nebo  $10^{-2}$  M. Dalším ředěním zásobního roztoku látek s pomocí DMSO nebo H<sub>2</sub>O, byla připravena koncentrační řada látek (viz postup měření) pro určení hodnoty IC<sub>50</sub>.
- Připravené zásobní roztoky byly důkladně promíchány a uloženy v mikrozkuvkách v mrazicím boxu při teplotě -80°C.

- Před použitím byly zásobní roztoky vyjmuty z mrazicího boxu a vytemperovány na teplotu 25 °C.

#### 4.4. Použité přístroje a pomůcky

- váhy Mettler Toledo AB204-S (Metler Toledo)
- ultrazvuková lázeň Sonorex digital 10P (Bandelin Electronic)
- třepačka mikrodestiček BIOSAN OS-10 (Biotech a.s.)
- sušárna Venticell 55 (BMT a. s.)
- vertex LABdancer IP 40 (IKA a.s.)
- analyzátor automatický mikrodestičkový reader EL800 ( Biotek Instruments, INC.)

#### 4.5. Postupy měření

- Před samotným měřením vzorků byla u každého z nich připravena, ze zásobního roztoku ředěním s pomocí DMSO nebo H<sub>2</sub>O koncentrační řada 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-5</sup> M.
- Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 170 μl 0,01 M SFP a 5 μl testované látky dané koncentrace (koncentrační škála). Obsah jamky byl promíchán třepačkou vertex LABdancer IP40. Dále bylo přidáno 5 μl enzymu (3U/ml), opět vše promícháno pomocí vertex LABdancer a 5 minut inhibováno na třepačce mikrodestiček BIOSAN OS-10. Následně bylo přidáno 20 μl 5 mM substrátu Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu. Objem reakční směsi byl 200 μl.
- Mikrotitrační destička byla vložena s reakční směsí na 30 min při teplotě 37 °C do inkubátoru (sušárny).
- Po 30 min byla mikrotitrační destička vytažena a byla změřena změna aktivity POP s pomocí ELISA readeru při vlnové délce 405 nm.
- Naměřené hodnoty byly zaznamenány v programu Microsoft Excel a pomocí programu GraphPad Prism vypočítány hodnoty IC<sub>50</sub>.
- Stejným způsobem byla měřena aktivita čistého enzymu. Přidaný objem inhibitoru byl nahrazen pufrém. Dále byl proměřen kontrolní vzorek testované látky bez enzymu a slepý pokus pufru se substrátem. Jako referenční standardní inhibitor byl použit Z-pro-prolinal.
- Každé měření bylo opakováno třikrát.



#### **4.6. Zpracování naměřených dat**

Data byla zpracována v programech Microsoft Office Excel 2007 a GraphPad Prism verze 5.02. Vzorce byly vytvořeny v programu ACD/ ChemSketch 12.

## V. VÝSLEDKY

### 5.1. Výsledky naměřených a vypočítaných hodnot IC<sub>50</sub>

Tab. 1 Inhibice izolovaných alkaloidů

	Látka	IC <sub>50</sub> (μM)
1	Allokryptopin	> 2500
2	(+)-Korydin	> 2500
3	(-)-Sinoakutin	> 2500
4	Papaverinium chlorid	401 ± 200
5	(+)-Korypalmin	128 ± 19,7
6	(+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin	135 ± 23,2
7	Salutaridin	143 ± 25,4
8	Retikulin	392 ± 184
9	Karyachin	> 2500
10	6-Ethoxy-6-dihydrosanguinarin	26 ± 7,96
11	Baikalin	576 ± 99,9
12	(-)-Isokorypalmin	> 2500
13	(+)-Kanadalin	> 2500
14	<i>O</i> -Methylkaryachin	> 2500
15	Argemonin	337 ± 83,1
16	6-Ethoxy-6-dihydrochelerythrin	42,3 ± 5,80
17	(±)-Korykavidin	> 2500
18	(+)-Kanadin	152 ± 51,5
19	Dihydrosanguinarin	99,1 ± 8,99
20	(+)-Hamayn	421 ± 124
21	Palmatin chlorid	1720 ± 97,1
22	(-)-8- <i>O</i> -Demethylmaritidin	430 ± 157
23	<i>N</i> -Methyllaurotetatin	164 ± 11,4
24	Evodiamin	73,6 ± 10,5
25	Hydrastinin hydrochlorid	248 ± 62,9
26	(-)-Sinaktin	52,9 ± 18,0
27	(-)-Bikukulin	190 ± 50,0
28	(+)-Parfumidin	99,2 ± 18,4
29	<i>N</i> -Methylkorydaldin	> 2500
30	Homolykorin	173 ± 40,6
31	Matrin	276 ± 50,8
32	Oxymatrin	304 ± 54,9
33	Chelidonin	> 2500
34	Boldin	> 2500
35	(+)-Tetrahydropalmatin	> 2500
36	Morfinium chlorid	1950 ± 666
37	Kodeinium fosfát	> 2500
38	( <i>S,R</i> )-Noskapin	> 2500
39	Huperzin A	> 2500
40	Eserin	> 2500
41	Rivastigminium tartarát	> 2500

## VI. DISKUZE

Při léčbě Alzheimerovy choroby se v současné době používají na základě EBM léčiva hlavně dvou farmakoterapeutických skupin a to kognitiva (hlavně inhibitory AChE) a látky ovlivňující poruchy přenosu na NMDA receptorech (*N*-methyl-D-aspartátový receptor), který představuje predominantní systém pro ovládání synaptické plasticity a paměťové funkce lidského mozku. Kognitiva zlepšují paměťové funkce tím, že blokují AChE a BuChE a zvyšují hladinu ACh. Mezi tyto látky patří rivastigmin, donepezil a galanthamin. Látky dobře pronikají přes HEB, avšak jejich použití s sebou nese i řadu nežádoucích účinků, jako je např. nechutenství, nauzea, dyspepsie, průjmy a vomitus, bolesti hlavy, atd. V případě inhibitorů NMDA receptorů je využíván pouze memantin. V případě dalších potenciálních léčiv, která by mohla efektivně zasáhnout do rozvoje Alzheimerovy choroby (např. elicitory  $\alpha$ -sekretasy, inhibitory  $\beta$ -sekretasy, modulátory  $\gamma$ -sekretasy, inhibitory tvorby A $\beta$  oligomerů, agonisté nikotinových receptorů, inhibitory POP, inhibitory GSK-3 $\beta$  případně agonisté transkripčního faktoru PPAR $\gamma$  nebo elicitory NGF) není dosud zcela jasno: v pokusech *in vitro*, případně při použití u experimentálních zvířat jsou tyto látky účinné, dosud však prakticky do humánní léčby neprošly. Je však zřejmé, že hlavními hledanými léčivy ze skupiny small molecules zůstanou nadále kognitiva a inhibitory NMDA receptorů. U těchto látek (především alkaloidní povahy) se pokládá za účelné hledat další biologické účinky, které by terapeutický efekt nových (potenciálních) především kognitiv prohloubily a splnily v maximální míře požadavky, které jsou v této době na nová léčiva kladeny. Jednou z takových skupin látek mohou být inhibitory prolyloligopeptidasy (prolylendopeptidasy) <sup>63</sup>.

Prolyloligopeptidasa (EC 3.4.21.26) se podílí na tvorbě a degradaci peptidových hormonů a neuropeptidů ( $\alpha$ -melanocyty stimulující hormon, LH-RH, thyrotropin-uvolňující hormon, angiotensin, neurotensin, oxytocin, substance P a vasopressin), přítomných v mozkové tkáni v extracelulárním prostoru. Její intracelulární lokalizace naznačuje řadu dosud ne zcela objasněných funkcí. Existuje názor, že „zrychlené stárnutí“ s ohledem na expresi enzymu v hippocampu může být faktorem pozorovaným u kognitivních deficitů ve fázi pre-plaku začínající Alzheimerovy choroby. V současnosti se zdá, že inhibice tohoto enzymu může proto vést k určitému zlepšení kognitivních funkcí. Studium této inhibice proto může přinést použitelné výsledky při ovlivňování neurodegenerativních onemocnění, resp. Alzheimerovy choroby. V literatuře existují údaje o možném vícefunkčním zásahu některých přírodních látek vůči hlavním enzymovým systémům mozku (např. látky z *Clavicornia*) <sup>64</sup>.

V současné době se stále diskutuje o smysluplnosti hledání nových léčiv, které by primárně inhibovaly POP. Ačkoliv existuje řada syntetických látek, připravených s cílem inhibice uvedeného enzymu, není v tuto chvíli směr dalšího výzkumu jasný. Jasně však je to, co jsem uvedla výše: pokud budou existovat efektivní kognitiva, která zároveň budou inhibovat POP, budou účinná a bezpečná, pak představují směr dalšího experimentálního výzkumu v této oblasti <sup>63</sup>.

Tímto směrem byla motivována moje rigorózní práce: stanovila jsem inhibiční aktivitu POP u 41 látek alkaloidního charakteru (v převážné míře izolovaných z rostlin), které mi byly poskytnuty pracovní skupinou ADINACO Research Group z katedry farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, která studuje biologickou aktivitu především isochinolinových alkaloidů a alkaloidů rostlin z čeledi Amaryllidaceae z hlediska jejich kognitivních účinků *in vitro*.

Jako standard jsem použila v *in vitro* testech flavonoid baikalin ( $IC_{50}$   $576 \pm 99,9 \mu M$ ), už dříve izolovaný z kořenů šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis* Georgi). Látka je vhodná pouze pro *in vitro* studium, protože nemá schopnost proniknout přes HEB (jedná se o polární flavonoidní glykosid). Schopnost průniku má však jeho aglykon baikalein, který z části vzniká po štěpení glykosidické vazby baikalinu v trávicím traktu. Ačkoliv se jedná o látku významně lipofilnější než je jeho glykosid a dal by se teoreticky předpokládat výrazně lepší přechod přes HEB, těžko lze prakticky u lidského mozku očekávat (a také to nebylo prokázáno) výraznou inhibici POP. V literatuře sice existuje zmínka o tom, že tato látka má velký potenciál při léčbě AD ale její účinek je závislý na konkrétní dávce <sup>59,60</sup>. Účinek látky *in vivo* je však spíše přáním: flavonoidy jsou látky polární pro přechod přes HEB (i když se jedná o aglykony), jsou obtížně rozpustné ve vodě (zejména aglykony), v GIT pro ně neexistuje žádný specifický přenašečový systém, který by jejich resorpci mohl urychlit, ale především to jsou látky, které probíhají výrazné biotransformaci už ve střevě, vlivem bakteriální mikroflóry. Pokud by byl baikalin (nebo baikalein) účinný ve vysoké dávce (stovky miligramů), pak jeho použití nemá smysl, protože tato látka by určitě nežádoucím způsobem zasáhla do aktivity řady enzymových systémů v lidském organismu.

Další látkou, která se používá jako referenční látka je berberin z koptisu čínského (*Coptis chinensis*), případně z dřišťálu obecného (*Berberis vulgaris*) nebo vodilky kanadské (*Hydrastis canadensis*). Strukturou se řadí do skupiny isochinolinových alkaloidů kvartérního typu. Tato látka vykazuje údajně neuroprotektivní vlastnosti a zlepšuje krevní cirkulaci

v mozku (je také popisován zásah do apoptózy). Díky těmto vlastnostem je berberinu věnovaná pozornost také při ovlivňování AD<sup>65,66</sup>. Jak jsem však už uvedla – je to látka kvartérního typu a látky tohoto charakteru obtížně přecházejí přes HEB. K dosažení efektivní koncentrace by bylo nutné velmi pravděpodobně zvýšit dávku a to je v případě berberinu nežádoucí, protože tento alkaloid je látkou do jisté míry toxickou.

Na základě naměřených hodnot vykazovaly inhibiční aktivitu alkaloidy izolované z některých zástupců čeledi Papaveraceae, konkrétně u rostliny *Chelidonium majus*. 6-Ethoxy-6-dihydrosanguinarin vykázal hodnotu  $IC_{50}$   $26,0 \pm 7,96 \mu M$ . Druhou nejvíce inhibující látkou byl dihydrosanguinarin s hodnotou  $IC_{50}$   $99,1 \pm 8,99 \mu M$  a třetí 6-ethoxy-6-dihydrochelerythrin, vykazující  $IC_{50}$   $42,3 \pm 5,80 \mu M$ . Všechny tyto alkaloidy patří do skupiny benzyltetrahydroisochinolinových alkaloidů, konkrétně s benzofenanthridinovým skeletem. Inhibiční účinky byly také nalezeny u některých alkaloidů z dymnivky duté (*Corydalis cava*), máku setého (*Papaver somniferum*), sluncovky kanadské (*Eschscholtzia californica*) a zemědělní lékařského (*Fumaria officinalis*). Zde sledované alkaloidy vykazovaly tyto aktivity, např. salutaridin měl hodnotu  $IC_{50}$   $143 \pm 25,4 \mu M$ , papaverin (ve formě hydrochloridu)  $IC_{50}$   $401 \pm 200 \mu M$ , retikulin  $392 \pm 184 \mu M$ , korypalmin  $128 \pm 19,7 \mu M$  a parfamidin,  $IC_{50}$   $99,2 \pm 18,4 \mu M$ . Pro další studium v této oblasti nemají uvedené látky význam, protože jejich „nosná“ inhibice (tj. inhibice AChE nebo BuChE) byla nevýznamná. Jedinou látkou, která je účinná z hlediska inhibice AChE je kanadin, z hlediska inhibice POP však není její aktivita významná ( $IC_{50}$   $152 \pm 51,5 \mu M$ ).

*Zephyranthes robusta* patří do čeledi Amaryllidaceae. Tato čeleď je charakteristická tím, že v řadě taxonů obsahuje významný alkaloid – galanthamin. Galanthamin se používá při léčbě Alzheimerovy choroby jako AChE inhibitor (kognitivum). Jako inhibitor PEP se však neosvědčil. Dalšími izolovanými látkami ze *Zephyranthes robusta* byl hamayn,  $IC_{50}$   $421 \pm 124 \mu M$ , homolykorin,  $IC_{50}$  je  $173 \pm 40,6 \mu M$  a 8-O-demethylmaritidin,  $IC_{50}$   $430 \pm 157 \mu M$ . Aktivity těchto látek z hlediska inhibice POP nejsou výrazné, ani u 8-O-demethylmaritidinu, který je aktivní jako inhibitor AChE.

Evodiamin izolovaný z *Evodia rutaecarpa* vykazoval  $IC_{50}$   $73,6 \pm 10,5$ . Tento alkaloid byl zahrnut do souboru proto, že se řadí svojí strukturou k indolovým alkaloidům, a proto lze pokládat za instruktivní jeho biologickou aktivitu.

Podobně byly do souboru zařazeny matrin s hodnotou  $IC_{50} 276 \pm 50,8 \mu M$  a oxymatrin s  $IC_{50} 304 \pm 54,9 \mu M$ , izolované ze *Sophora flavescens*. Oba alkaloidy jsou chinolizidinového typu, které jsou charakteristické pro zástupce čeledi Fabaceae.

Huperzin A je přírodní, vysoce aktivní AChE inhibitor izolovaný z *Huperzia serrata* (Huperziaceae), který se v blízké době stane reálným léčivem jako kognitivum. V Číně je už schválen jako léčivo pro Alzheimerovu chorobu a kromě svých kognitivních účinků má neuroprotektivní vlastnosti. Existuje názor, že jedním z mechanismů účinku huperzinu může být i snížení hladiny železa v mozku (zvýšená hladina železa v mozku vede k poškození nervové tkáně, atrofii neuronů) <sup>67,68</sup>. V našem měření nebyl prokázán žádný účinek proti POP.

Syntetický rivastigminium tartarát byl zaveden do praxe při léčbě AD, avšak jako AChE a BChE inhibitor. Jako inhibitor POP nevykazuje žádné slibné výsledky.

Ze struktury měřených látek je patrné, že většina molekul jsou molekuly lipofilní, což je také předpokladem pro dobrý průnik do CNS. Alkaloidy vykazující inhibiční aktivitu jsou isochinolinového typu. Hodnotami  $IC_{50}$  se nejvíce k referenční látce baikalinu blíží rekulin, hamayn a 8-O-demethylmaritidin. Zdá se, že by tyto látky mohly být perspektivní pro další studium inhibice POP, především však musí být studovány jejich parciální deriváty.

## VII. LITERATURA

- 1) <http://www.uzis.cz/publikace/zemreli-2012>
- 2) ROTH J. Neurodegenerace: jeden mechanismus pro mnoho chorob? *Zdraví E15*, Lékařské listy. 7/2009.
- 3) HAMPEL H. The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Prog. Neurobiol.* 2011; 95(4), 718–728.
- 4) QUI C., KIVIPELTO M., VON STRAUSS E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants and strategies toward intervention. *Dialog. Clin. Neurosci.* 2009; 11(2), 111-128.
- 5) KALARIA R.N., MAESTRE G.E., ARIZAGA R. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factor. *Lancet. Neurol.* 2008; 7(9), 812-826.
- 6) WIJA P. Demence: Priorita pro systém zdravotnictví. *ÚZIS.* 63/12, 2012.
- 7) RADFORD K., MACK H.A., DRAPER B. Prevalence of dementia in urban and regional Aboriginal Australians. *Alzheimers Dement.* 2014; S1552-5260(14), 113-117.
- 8) KOUKOLÍK F., JIRÁK R. *Alzheimerova nemoc a další demence.* Grada, Praha 1998.
- 9) KOUKOLÍK F., JIRÁK R.: *Demence: Neurobiologie, klinický obraz, terapie.* Galén, Praha 2004.
- 10) Vlček J., Fialová D. *Klinická farmacie I.* Grada, Praha 2010.
- 11) HENDERSON V.W., PAGANINI – HILL A., MILLER M.D. Estrogen for Alzheimer's disease in women. *Neurol.* 2000; 54(2295). Doi: 10.1212/WNL.54.2.295

- 12) PANIDIS D.K., MATALLIOTAKIS I.M., ROUSSO D.H. The role of estrogen replacement therapy in Alzheimer's disease. *European Jostert Gynecol. Repr. Biol.* 2001; 95(1), 86-91.
- 13) YAFFE K., SAWAYA G., LIEBERBURG I. Estrogen therapy in postmenopausal women. Effect on cognitive funkcion and dementia. *JAMA.* 1998; 279(9), 688-695.
- 14) SOSA-ORTIZ A.L., ACOSTA-CASTILLO I., PRINCE M.J. Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease. *Arch. Med. Res.* 2012; 43(8), 600–608.
- 15) LEVEY A.I., EDMUNDS S.M., KOLIATSOS V. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J. Neurosci.* 1995; 15(5), 4077-4092.
- 16) PICCIOTTO M.R. HIGLEY M.J., MINEUR Y.S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 2012; 76(1), 116-129.
- 17) SHER E., CHEN Y., SCHARPLES T.J. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004; 4(3), 283-297.
- 18) ORHAN I.E. Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 2012; 19(14), 2252-2261.
- 19) NATHANSON N.M. Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Ther.* 2008; 119(1), 33-43.
- 20) LINCOVÁ D., FARGHALI H. *Základní a aplikovaná farmakologie.* Galén, Praha 2007.



- 21) TERRY A.V., BUCCAGUSCO J.J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 306(3), 821-827.
- 22) OHNO M., HIRAOKA Y., LICHTENTHALER S.F. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging.* 2014; 35(1), 213-222.
- 23) FRASER P.E., LÉVESQUE L., McLAHLAN D.R. Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin. Biochem.* 1993; 26(5), 339-349.
- 24) BRION J.P. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 1998; 40(3), 130-140.
- 25) <http://www.brightfocus.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html>  
.použito dne 16.1.2015
- 26) MANCUSO M., ORSUCCI D., LoGERFO A. Clinical features and pathogenesis of Alzheimer's disease: involvement of mitochondria and mitochondrial DNA. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 685(2), 34-44.
- 27) MANCUSO M., CALSOLARO V., ORSUCCI D. Is there a primary role of the mitochondrial genome in Alzheimer's disease? *J. Bioenerg. Biomembr.* 2009; 41(5), 411-416.
- 28) ALIEV G., PRIVADARSHINI M., REDDY V.P. Oxidative Stress Mediated Mitochondrial and Vascular Lesions as Markers in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Curr. Med. Chem.* 2014; 21(19), 2208-2217.
- 29) ZILKA N., FERENCIK M., HULIN I. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? *Bratisl. Lek. Listy* 2006; 107(109-110), 374-383.

- 30) AKIYAMA H., BARGER S., BARNUM S. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2000; 21(3), 383-421.
- 31) FERENCIK M., NOVAK M., ROVENSKY J. Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bratisl. Lek. Listy.* 2001; 102(3), 123-132.
- 32) VENÄLÄINEN J. Charakterization of Prolyl Oligopeptidase and its Inhibition. *Thesis.* Univerzity of Kuopio, 2005.
- 33) GARCÍA-HORMAN J.A., MÄNNISTÖ P.T., VENÄLÄINEN J.I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007; 41(1), 1-24.
- 34) JARHO E.M., VENÄLÄINEN J.I., JUNTUNEN J. An introduction of a pyridine group into the structure of prolyl oligopeptidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16(21), 5590-5593.
- 35) CHEVALLIER S., GOELTZ P., THIBAUT P. Characterization of a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Complete sequence and localization of the active-site serine. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(12), 8192-8199.
- 36) IRAZUSTA J., LARRINAGA G., GONZÁLEZ-MAESO J. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 2002; 40(4), 337-345.
- 37) YOSHIMOTO T., OGITAA K., WALTER R. Post-proline cleaving enzyme: Synthesis of a new fluorogenic substrate and distribution of the endopeptidase in rat tissues and body fluids of man. *Biochim. Biophys. Acta* 1979; 569(2), 184-192.
- 38) TAYLOR W., ANDREWS P., HENRIKSON C.H. New fluorogenic substrates for a rat brain proline endopeptidase. *Anal. Biochem.* 1980; 105(1), 58-64.

- 39) VENÄLÄINEN J.I., GARCÍA-HORMAN J.A., FORSBERG M.M. Binding kinetics and duration of in vivo action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71(5), 683-692.
- 40) ROSENBLUM J.S., KOZARICH J.W. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003; 7(4), 496-504.
- 41) BIRKS J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006; (1): CD005593.
- 42) IMBIMBO B.P. Pharmacodynamic-tolerability relationships of cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 2001; 15(5), 375-390.
- 43) VNOUČKOVÁ K., JIRÁK R. Rivastigminum. *Remedia* 6/2003, 372-378.
- 44) FERRIS S.H., FARLOW M. Language impairment in Alzheimer's disease and benefits of acetylcholinesterase inhibitors. *Clin. Interv. Aging* 2013; (8), 1007-1014.
- 45) YANG Z.Z., ZHANG Y.Q, WANG Z.Z. Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration. *Int. J. Pharm.* 2013; 452(1-2), 344-354.
- 46) MARCO L., DO CARMO CARREIRAS M. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2006; 1(1), 105-111.
- 47) JIRÁK R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia.* 2009, 342-345.
- 48) [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz), použito dne 16.1.2015

- 49) PORTEVIN B., BENOIST A., RÉMOND G. New prolyl endopeptidase inhibitors: in vitro and in vivo activities of azabicyclo[2.2.2]octane, azabicyclo[2.2.1]heptane, and perhydroindole derivatives. *J. Med. Chem.* 1996; 39(12), 2379-2391.
- 50) KATSUBE N., SUNAGA K., AISHITA H. ONO-1603, a potential antimentia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 288(1), 6-13.
- 51) KATSUBE N., SUNAGA K., CHUANG D.M. ONO-1603, a potential antimentia drug, shows neuroprotective effects and increases m3-muscarinic receptor mRNA levels in differentiating rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 1996; 214(2-3), 151-154.
- 52) BARELLI H., PETIT A., HIRSCH E. S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 257(3), 657-661.
- 53) ARAI H., NISHIOKA H., NIWA S. Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase from canine brain. *Chem. Pharm. Bull.* 1993; 41(9), 1583-1588.
- 54) ATACK J.R., SUMAN-CHAUHAN N. DAWSON G. In vitro and in vivo inhibition of prolyl endopeptidase. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 205(2), 157-163.
- 55) JALKANEN A.J., PIEPPONEN T.P., HAKKARAINEN J. The effect of prolyl oligopeptidase inhibition on extracellular acetylcholine and dopamine levels in the rat striatum. *Neurochem. Int.* 2012; 60(3), 301-309.
- 56) JALKANEN A.J., HAKKARAINEN J, LEHTONEN M. Brain pharmacokinetics of two prolyl oligopeptidase inhibitors, JTP-4819 and KYP-2047, in the rat. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2011; 109(6), 443-451.

- 57) CHOUDHARY M.I., RANJIT R., ATTA-ur-RAHMAN. Novel sesterterpenes from *Leucosceptrum canum* of nepalese origin. *Org. Lett.* 2004; 6(23), 4139-4142.
- 58) SULTANOVA N., MAKHMOOR T., YASIN A. Isotamarixen - a new antioxidant and prolyl endopeptidase-inhibiting triterpenoid from *Tamarix hispida*. *Planta Med.* 2004; 70(1), 65-67.
- 59) TARRAGÓ T. KICHIK N., CLAASEN B. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16(15), 7516-7524.
- 60) SRINIVAS N.R. Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives. *Xenobiotica* 2010; 40(5), 357-367.
- 61) TARRAGO T., KICHIK N., SEGUÍ J. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem.* 2007; 2(3), 354-359.
- 62) KULKARNI SK., ASHISH D. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potencial for central nervous system disorders. *Phytotherapy Res.* 2010; 24(3), 317-324.
- 63) CAHLÍKOVÁ, L., MACÁKOVÁ, K., BENEŠOVÁ, N., CHLEBEK, J., HOŠŤÁLKOVÁ, A., OPLETAL, L.: Natural Componuds (Small Molecules) as Potential and Real Drugs of Alzheimer's Disease: A Critical Review, in: *Studies in Natural Procucts Chemistry* (ATTA-ur-RAHMAN, ed.), Chapter 6, Elsevier: Amsterdam 2014, 153-194.
- 64) Han, Yeong Hwan; Lee, Tae Hee; Park, Young Il: Compositions for inhibiting activity of acetylcholine esterase, prolyl endopeptidase and  $\beta$ -secretase comprising *Clavicornona pyxidata* extracts. Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo.; (2006), KR 2006116280 A 20061115, Chem. Abstr 146, 493568 (2007).
- 65) YE M., FU S., PI R. Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 61(7), 831-837.

66) HUANG Z.J., ZENG Y., LAN P. Advanced in structural modification and biological activities of berberine: an active compound in traditional Chinese medicine. *MiniRev. Med. Chem.* 2001; 11(13), 1122-1129.

67) HUANG XT., QIAN ZM., He X. reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2014; 35(5), 1045-1054.

68) <http://chytredrogy.eu/nootropika/huperzin-a/>, použito dne 16.1.2015

## VIII. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Mgr. Lucie Ibrmajerová

Školitel: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Název rigorózní práce: Přírodní látky a jejich biologická aktivita X. Screening vybraných alkaloidů na inhibici prolyloligopeptidasy

Alzheimerova choroba je nejzávažnějším a nevléčitelným neurodegenerativním onemocněním, jehož incidence roste. Z těchto důvodů jsou hledány nové terapeutické postupy a především léčiva, která by rozšířila portfolio využitelných terapeutických prostředků. V současné době (na základě evidence based medicine) přicházejí v úvahu dvě hlavní skupiny léčiv: kognitiva (inhibitory AChE, případně BuChE) a antagonisté NMDA receptorů. Přestože příčiny vzniku uvedené choroby nejsou známy, jsou známy dílčí patofyziologické procesy, které se při rozvoji choroby uplatňují. Hledání nových kandidátních léčiv v dalších oblastech je předmětem rozvíjejícího se výzkumu. Jednou z těchto oblastí je hledání inhibitorů prolylendopeptidasy, které se mohou velmi příznivě uplatnit v procesech spojených s pamětí a učením.

V této práci bylo podrobeno studiu inhibice prolylendopeptidasy 41 látek alkaloidní povahy (isochinolinové a chinolizidinové alkaloidy, alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae), které byly dříve studovány na inhibici AChE a BuChE a které byly získány od pracovní skupiny ADINACO Research Group (UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie). Hodnotami  $IC_{50}$  se nejvíce k referenční látce baikalinu, blíží argemonin, hamayn a 8-O-demethylmaritidin. Z hlediska inhibice AChE a BuChE jsou však všechny látky s výjimkou 8-O-demethylmaritidinu neaktivní ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ; 8-O-demethylmaritidin  $IC_{50} 28,02 \pm 2,42 \mu M$  (AChE)). Do jaké míry budou tyto látky vhodné pro další práci, ukáže studium jejich aktivity na další enzymové systémy lidského mozku (inhibice BACE1, GSK-3 $\beta$ ).

Klíčová slova: Alzheimerova nemoc, prolyloligopeptidasa, alkaloidy

## IX. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Lucie Ibrmajerová

Consultant: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of thesis: Natural compounds and their biological activity X. Screening of selected alkaloids on inhibition of prolyl oligopeptidase

Alzheimer's disease is the most serious and incurable neurodegenerative disease, which incidence is increasing. For these reasons, the search for new therapeutic practices and especially medicines that would expand the portfolio of useful therapeutic agents. At the present time (based on EBM) two main groups of drugs come into consideration: cognitives (AChE, or BuChE inhibitors) and NMDA receptor antagonists. Although the causes of the disease are not known, partial pathophysiological processes that are applied in the development of the disease are known. The search for new drug candidates in other areas is subject of an emerging research. One of these areas is the search for inhibitors prolyl endopeptidase which can favorably be applied in processes related to memory and learning.

In this work, 41 alkaloidal substances (isoquinoline and quinolizidine alkaloids, alkaloids of plants from the family Amaryllidaceae), which were previously studied on the inhibition of AChE and BuChE, which were obtained from the working group ADINACO Research Group (Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology). Have been subjected to the study of POP inhibition. The  $IC_{50}$  value of reference substance baicalin is approaching most by reticuline, argemone, hamayne and 8-O-demethylmaritidine. However, all substances except 8-O-demethylmaritidine are inactive ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ; 8-O-demethylmaritidine  $IC_{50} 28,02 \pm 2,42 \mu M$  (AChE)) from the inhibition of AChE and BuChE point of view. The study of their effect on other human brain enzyme systems (inhibition of BACE1, GSK-3 $\beta$ ) shows to which extent these substances are suitable for further work.

Key words: Alzheimer's disease, prolyl oligopeptidase, alkaloids



