

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin

6. Alkaloidy *Zanthoxylum nitidum* a jejich biologická aktivita

Biologically active metabolites of plants

6. Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* and their biological activity

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Lada Krejčová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, který 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.

Hradec Králové, květen 2012

Lada Krejčová

Tato diplomová práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV UK – 2012 – 265002 a Fondu rozvoje vysokých škol FRVŠ 664/2011.

Děkuji Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za věnovaný čas, vstřícný přístup a odborné rady při praktickém i písemném zpracování diplomové práce. Mé poděkování patří též Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za stanovení biologických aktivit izolované látky a kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemně strávený čas v jejich společnosti. Na závěr chci velmi poděkovat mé rodině a příteli za veškerou podporu během celého období studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Demence.....	9
3.2. Alzheimerova choroba.....	10
3.2.1. Klinický obraz	10
3.2.2. Neuropatologie	11
3.2.3. Rizikové vlivy pro rozvoj Alzheimerovy choroby	13
3.2.4. Terapie Alzheimerovy choroby	14
3.2.4.1. Kognitiva	14
3.2.4.2. Inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému	16
3.2.4.3. Nootropika a další látky zvyšující mozkový metabolismus.....	17
3.2.4.4. Další perspektivní látky a přístupy k léčbě Alzheimerovy choroby	18
3.2.4.5. Farmakoterapie poruch chování u alzheimerovských pacientů	19
3.2.4.6. Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy choroby	20
3.2.5. Další látky potenciálně využitelné v terapii Alzheimerovy choroby jako inhibitory cholinesteráz.....	20
3.2.5.1. Přírodní alkaloidní zdroje inhibitorů cholinesteráz.....	20
3.2.5.2. Přírodní nealkaloidní zdroje inhibitorů cholinesteráz	21
3.2.5.3. Syntetické zdroje inhibitorů cholinesteráz	21
3.3. <i>Zanthoxylum nitidum</i> (Roxb.) DC. (Rutaceae) a další druhy rodu <i>Zanthoxylum</i>	23
3.3.1. Taxonomické zařazení <i>Zanthoxylum nitidum</i>	24
3.3.2. Morfologický popis <i>Zanthoxylum nitidum</i>	25
3.3.3. Výskyt rostlin rodu <i>Zanthoxylum</i>	25
3.3.4. Použití rostliny <i>Zanthoxylum nitidum</i> v lidovém léčitelství.....	25
3.3.5. Sekundární metabolity izolované ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	25
3.3.5.1. Benzo[c]fenanthridinový typ	26
3.3.5.2. Dihydrobenzo[c]fenanthridinový typ.....	27
3.3.5.3. Aporfinový typ.....	30
3.3.5.4. Protoberberinový typ.....	31
3.3.5.5. 2-chinolonový typ	32
3.3.5.6. Furochinolinový typ.....	32
3.3.5.7. Další alkaloidy	33
3.3.6. Další obsahové látky	33
3.3.7. Biologická aktivita alkaloidů izolovaných ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	34
3.3.7.1. Antivirová a antifungální aktivita	34
3.3.7.2. Protizánětlivá a analgetická aktivita.....	35
3.3.7.3. Protinádorová aktivita	36
3.3.7.4. Anticholinesterázová aktivita	36
3.3.8. Další zástupci rodu <i>Zanthoxylum</i> a biologická aktivita jejich sekundárních metabolitů.....	37
3.3.8.1. <i>Zanthoxylum capense</i>	37
3.3.8.2. <i>Zanthoxylum integrifoliolum</i>	38
3.4. Další významné rody podčeledi <i>Rutoideae</i>	40
3.4.1. Rod <i>Pilocarpus</i>	40
3.4.2. Rod <i>Agathosma</i>	42

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
4.1. Všeobecné postupy.....	44
4.1.1. Destilace a odpařování.....	44
4.1.2. Chromatografie.....	44
4.1.2.1. Sloupcová chromatografie.....	44
4.1.2.2. Tenkovrstvá chromatografie.....	44
4.2. Materiál a vybavení.....	45
4.2.1. Rozpouštědla.....	45
4.2.2. Chemikálie.....	45
4.2.3. Chemikálie a materiál použité ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	45
4.2.3.1. Chemikálie.....	45
4.2.3.2. Materiál.....	46
4.2.4. Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	46
4.2.5. Chemikálie a materiál pro stanovení antioxidační aktivity.....	46
4.2.6. Přístroj použitý pro stanovení antioxidační aktivity.....	46
4.2.7. Detekční činidla.....	46
4.2.8. Chromatografické adsorbenty.....	47
4.3. Příprava sumárního extraktu ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	47
4.3.1. Původ drogy.....	47
4.3.2. Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu.....	47
4.3.3. Sloupcová chromatografie výtřepku A ze <i>Zanthoxylum nitidum</i>	48
4.3.4. Zpracování frakce G.....	50
4.4. Určení struktury izolované látky.....	51
4.4.1. MS analýza.....	51
4.4.2. NMR analýza.....	51
4.5. Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity alkaloidu.....	52
4.5.1. Podmínky měření.....	52
4.5.2. Příprava erytrocytárních pouzder.....	52
4.5.3. Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC ₅₀).....	52
4.6. Stanovení antioxidační aktivity získaného alkaloidu (EC ₅₀).....	53
5. VÝSLEDKY.....	54
5.1. Strukturní analýza liriideninu.....	54
5.1.1. MS studie liriideninu.....	54
5.1.2. NMR studie liriideninu.....	54
5.1.2.1. ¹ H NMR spektrum liriideninu.....	55
5.1.2.2. ¹³ C NMR spektrum liriideninu.....	56
5.2. Inhibiční aktivita vůči HuAChE a HuBuChE.....	56
5.3. Antioxidační aktivita.....	57
6. DISKUZE A ZÁVĚR.....	58
7. LITERATURA.....	60
8. SEZNAM ZKRATEK.....	70

1. ÚVOD

Člověk se nachází na vrcholu své fyzické výkonnosti přibližně ve věku 30 let. Poté lidský organismus ztrácí každým rokem průměrně 0,8 % své energie a výkonnosti. Příčiny tohoto jevu, tj. stárnutí, nejsou dosud zcela známé. Existuje několik teorií, jež polemizují o příčinách stárnutí a nepřímo tak i o příčinách neurodegenerativních změn spojených s přibývajícím věkem. Díky zlepšení životních podmínek a významným pokrokům v medicíně se stále prodlužuje průměrná délka života. Ovšem v pokročilém věku už funkce, které nejsou pro život zcela esenciální, postupně zanikají. Jako každý jiný orgán, také mozek může být postižen chorobou, a to především právě při procesu stárnutí, v jehož průběhu se množství a kvalitativní zastoupení molekul a buněk mění. Ještě před několika desítkami let bylo na zhoršování paměti ve vyšším věku nahlíženo jako na jev zcela běžný, normální, a proto nebylo považováno za nutné věnovat zvýšenou pozornost něčemu, co je „přirozené“. Jenže dnes, v době moderních vysoce citlivých vyšetřovacích metod, jsou považovány za čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí právě progresivní ztráta nejprve krátkodobé, následně též dlouhodobé paměti, a s tím související organické změny v CNS člověka¹.

Nejčastější příčinou syndromu demence je Alzheimerova choroba (AD). Jde o nemoc, při které dochází k narušení mnoha vyšších korových funkcí, jež se projevuje progresivní ztrátou paměti, poruchou myšlení, orientace, chápání, uvažování, schopností učení, ovlivněna je rovněž řeč a úsudek. I přes vysoký stupeň mentálního úpadku není vědomí postiženého člověka narušeno². Počet nemocných AD se od věku 65 let každých 5 let přibližně zdvojnásobuje. Ve věku nad 85 let by tudíž mělo touto chorobou trpět odhadem 20 – 50 % populace³. Typickými patologickými znaky AD jsou senilní plaky, neuronální klubka a úbytek neuronů, a to především cholinergních. Deficit acetylcholinu se pak podílí na kognitivních poruchách, poklesu pozornosti a rychlosti zpracování informací a rovněž na poruchách chování⁴.

I přes obrovské pokroky nejen v oblasti medicíny není do dnešního dne etiologie AD plně objasněna. Proto dosud nelze tuto nemoc léčit kauzálně. Ovlivňují se tudíž patogenetické mechanismy známé, což ovšem umožňuje pouze zpomalení progresu choroby. Farmakoterapeutické přístupy tzv. založené na důkazech („evidence-based“) jsou zatím pouze dva – léčba pomocí inhibitorů cholinesteráz (IChE) a inhibitorů *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů. IChE ovlivňují narušenou acetylcholinergní neurotransmisi. Jsou indikovány hlavně u lehkých a středně těžkých stadií AD. Z této skupiny látek se v současnosti u nás a ve většině zemí světa používají donepezil, rivastigmin a galanthamin⁵. Velmi nadějně výsledky pak poskytuje huperzin A, který je v současné době intenzivně studován. Předpokládá se, že by mohl v blízké době obohatit spektrum využívaných IChE⁶. Dosud jediným v praxi používaným léčivem ze skupiny inhibitorů NMDA receptorů je memantin, indikovaný u těžkých stadií AD⁵.

Izolace galanthaminu z *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) a jeho uvedení do terapie AD podnítily snahu o nalezení dalších účinných IChE přírodního původu. V posledních letech probíhá intenzivní screening rostlinných extraktů a jejich jednotlivých složek jakožto potenciálních přírodních zdrojů IChE se silnějšími účinky terapeutickými a slabšími účinky vedlejšími. Inhibiční aktivita vůči AChE nebo BuChE byla prokázána u poměrně širokého spektra látek, především u alkaloidů různých rostlinných druhů. Přestože mnohé z nich projevily silnější cholinesterázový inhibiční efekt než látky dosud v terapii využívané, jejich nežádoucí účinky byly natolik závažné, že nemohou být zařazeny do klinického testování jako nová nadějná léčiva AD. Také z tohoto důvodu se zvyšuje zájem i o nealkaloidní přírodní substance, které by mohly postrádat některé toxické účinky alkaloidů⁷.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

1. zpracování 9,6 kg suché drogy *Zanthoxylum nitidum*, příprava alkaloidních frakcí dle pH,
2. chromatografie jedné frakce za účelem izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě,
3. stanovení základních fyzikálně-chemických charakteristik získaných látek,
4. příprava vzorků pro stanovení biologických aktivit izolovaných látek (inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, antioxidační aktivita).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Demence

Demence je syndrom, který vzniká v důsledku chronického nebo progresivního onemocnění mozku. Projevuje se narušením mnoha kognitivních funkcí, např. poruchou paměti, myšlení, chápání, uvažování, orientace v prostoru, schopnosti učení, řeči či úsudku. Vědomí však není kvalitativně ani kvantitativně narušeno^{2,8}.

Přestože incidence demence stoupá s věkem, nejedná se o přirozený proces doprovázející stárnutí. Dochází při ní k patologickým procesům v mozkové kůře a podkoří⁸.

Při stanovení klinické diagnózy syndromu demence je nutné nejprve vyloučit delirium, depresi a lékově navozené symptomy demence. Teprve poté se uplatňují zejména DSM-IV kritéria demence (Diagnostický a statistický manuál duševních chorob), která vyhodnocují demenci jako poruchu paměti a navíc postižení alespoň jedné další funkce – řeči, myšlení, orientace, poznávání, úsudku, učení, plánování, abstraktního myšlení, pozornosti. Postupně se snižuje celkově úroveň výkonnosti a pracovní či společenské zapojení pacienta. K vyhodnocení úrovně kognitivního deficitu slouží řada neuropsychologických testů, které se zabývají funkcí frontálních laloků, paměti a kognitivním tempem. Jedním z nich je například test MMSE (Minimal State Examination – Krátká škála mentálního stavu) či „Test kreslení hodin“. Přes všechna platná diagnostická kritéria umožňuje finální diagnózu demence až neuropatologické vyšetření získané biopticky nebo nekropticky^{8,9}.

Demence lze zjednodušeně klasifikovat na několik typů:

1. primární degenerativní demence – např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba s demencí, demence s Lewyho tělísky, Huntingtonova choroba, Pickova nemoc aj.
2. vaskulární demence – multiinfarktová demence, onemocnění malých cév s demencí, ischemicko-hypoxická demence, hemoragická demence aj.

3. sekundární demence – stavy, v jejichž důsledku se mohou vyskytnout příznaky demence – metabolické poruchy, poruchy výživy, záněty CNS, nádory mozku, úrazy apod.
4. smíšené demence – kombinace více onemocnění vyvolávajících demenci⁸.

3.2. Alzheimerova choroba

Celosvětově nejčastější příčinou demence je Alzheimerova choroba (AD). Incidence i prevalence této nemoci výrazně roste s věkem. Počet nemocných se od věku 65 let každých 5 let přibližně zdvojnásobuje³. Ve vysokém věku jsou ženy ohroženější než muži. Riziko výskytu demence Alzheimerovského typu je u žen až 3krát vyšší než u mužů¹⁰.

Dle výskytu prvních příznaků nemoci se rozlišují dvě formy AD:

1. raná (presenilní) forma – klinické projevy choroby se objevují před 65. rokem věku; obvykle bývá podmíněna geneticky. Presenilní forma se vyskytuje poměrně vzácně.
2. pozdní (senilní) forma – příznaky se objevují po 65. roce věku, průběh nemoci je oproti rané formě delší. Senilní forma je výskytem mnohem častější¹¹.

3.2.1. Klinický obraz

Příznaky AD se typicky vyvíjejí plíživě, nenápadně. Zpočátku nemusí být jednoduché odlišit je od běžných projevů doprovázejících normální stárnutí¹².

Symptomy AD lze primárně rozdělit na poruchy kognitivní a nekognitivní:

1. Kognitivní poruchy

Poruchy paměti a učení, potíže s vybavováním čerstvě uložených paměťových dat, poruchy vizuospeciálních funkcí, plánování, úsudku, neschopnost orientace v prostoru a čase, poruchy soudnosti, logického myšlení, obsahově prázdná řeč, ztráta významu slovních spojení, potíže s rozpoznáváním předmětů i lidí apod.

Zpočátku je postižena zejména paměť recentní, v průběhu onemocnění je však zasažena rovněž paměť dlouhodobá.

2. Nekognitivní poruchy

Jedná se o poruchy chování, které způsobují potíže pacientovi, ošetřovateli nebo osobám v okolí pacienta. Mezi poruchy chování bez agresivity se řadí zejména neklid, nevhodné upoutávání pozornosti, výkřiky, naříkání, toulání se venku. Je-li přítomna agresivita, ať už verbální či brachiální, může být namířena jak na věci, tak někdy též proti lidem, a to zejména proti nejbližším osobám. Ve středních a pozdních stádiích nemoci doprovází poruchy chování také psychotické příznaky – bludy a halucinace. 25 – 50 % nemocných trpí depresí. Časté jsou rovněž poruchy spánku.

Uvedené kognitivní i nekognitivní poruchy vedou, společně s progresí nemoci, až k poruchám běžných denních aktivit. Nejprve jsou narušeny složitější činnosti, později dochází k úpadku veškerých základních úkonů jako například hygienické návyky, oblékání, chůze atd. To vše pochopitelně znemožňuje pacientovi schopnost pracovat a účastnit se společenského života. V závěru života bývají tyto pacienti nesoběstační a plně odkázáni na pomoc druhých^{5,11,13}. Od objevení se prvních příznaků choroby do úmrtí obvykle uplyne 7 – 10 let¹¹.

3.2.2. Neuropatologie

Patofyziologii AD charakterizují tři základní děje: ukládání extracelulárních depozit (senilních plak), ukládání intracelulárních depozit (neuronálních klubek) a úbytek neuronů¹⁴.

Senilní plaky se v mozku vyskytují v malém množství u všech starších lidí jako projev normálního stárnutí mozku. U AD se však v mozku tvoří plaky ve větším rozsahu. Uvnitř těchto útvarů se pak nachází β -amyloid, který vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP)¹⁵. APP je dlouhý transmembránový protein s dosud nevyjasněnou fyziologickou funkcí. U zdravých lidí je APP štěpen převážně enzymem α -sekretázou na krátké rozpustné fragmenty o délce 40 aminokyselin. U AD se však na

štěpení APP podílejí hlavně enzymy β - a γ -sekretáza, jež tvoří segmenty o délce 42 a více aminokyselinách, které jsou silně amyloidogenní^{11,16}. β -peptid₄₂ nejprve oligomeruje. Takto dvě spojené molekuly jsou velmi neurotoxické. Následně dochází ke koagulaci a polymeraci peptidů, čímž vzniká patologický β -amyloid. V místě výskytu senilních plak dochází ke sterilnímu zánětu, kdy se uvolňují z aktivované mikroglie působky akutní zánětlivé fáze, aktivují se zánětlivé enzymy cyklooxygenázy, uvolňuje se nadměrné množství excitačních aminokyselin, volných radikálů atd¹¹. β -amyloid je pokládán za klíčový patogenetický článek degenerativních procesů při AD, jelikož přítomnost senilních plak koreluje s poškozením kognitivních funkcí¹⁵.

Neuronální klubka (tangles) se na rozdíl od senilních plak nacházejí uvnitř neuronů. Hlavní složku klubek tvoří párová spirální vlákna, která obsahují především nadměrně fosforylovaný protein τ . Jedná se o vazebný protein s nízkou molekulovou hmotností asociovaný s mikrotubuly. τ -protein se váže na tubulin mikrotubulů, a tím startuje jejich polymeraci. Při hyperfosforylaci je tato vazba narušena. Na hyperfosforylaci τ -proteinu se podílí několik typů kináz a fosfatáz, avšak jako nejvýznamnější se jeví glykogen syntáza kináza 3- β (GSK3 β)^{11,15}.

Neurony postižené neuronálními klubky či oxidačním stresem podléhají neurodegeneraci, a tím dochází k atrofii mozku¹¹. Nejvýznamnější v patofyziologii AD je ztráta cholinergních neuronů, jelikož deficit acetylcholinu se podílí na kognitivních poruchách, poklesu pozornosti, koncentrace a rychlosti zpracování informací a rovněž na poruchách chování. U lidí postižených AD jsou zasaženy všechny oddíly cholinergního systému. Nejvíce porušena je presynaptická část acetylcholinergního neuronu – je snížena syntéza acetylcholinu enzymem cholinacetyltransferázou (CAT), která syntetizuje neuromediátor z cholinu a acetylkoenzymu A. Po uvolnění z vazby na receptor je acetylcholin v mozku odbouráván přednostně acetylcholinesterázami (AChE) na kyselinu octovou a cholin. U AD se však v mozku zvyšuje navíc hladina jinak minoritní butyrylcholinesterázy (BuChE), a to zejména v oblastech senilních plak^{4,17}.

Pro mechanismy učení je kromě cholinergního systému velmi významný také systém glutamatergní, který je s postupným zhoršováním AD rovněž postižen. U AD totiž dochází ke zvýšenému uvolňování excitačních aminokyselin, které působením na *N*-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory otevírají kalciové kanály, a proto do neuronů proudí více vápenatých iontů. Tím se narušuje stabilita vnitřního prostředí neuronu, aktivují se chorobné geny včetně genu pro apoptózu^{2,18,19}. Toto společně s předchozími patologickými ději napomáhá rozvoji AD.

3.2.3. Rizikové vlivy pro rozvoj Alzheimerovy choroby

Jak raná, tak i pozdní forma AD se vyskytuje preferenčně v některých rodinách. Předpokládá se proto, že na výskytu nemoci se podílí kombinace vlivů zevního prostředí s vlivy genetickými²⁰⁻²².

Pro pozdní formu AD je rizikovým faktorem nosičství alely ϵ -4 apolipoproteinu E (apoE) na chromozomu 19 a zřejmě mutace genu A2M na chromozomu 12^{15,23}. ApoE se nejčastěji vyskytuje ve třech izoformách – apoE2, apoE3 (nejčastější) a apoE4. Jednotlivé izoformy se liší pouze (ne)přítomností cysteinu v určitém místě proteinového řetězce. ApoE2 pravděpodobně snižuje riziko vzniku AD¹.

Časná forma AD vykazuje mnohem výraznější rodinnou závislost^{24,25}. Asi polovinu dědičných forem AD představují mutace genů, jejichž výsledkem je postižení procesu zrání a štěpení APP. Mezi tyto geny patří gen APP na chromozomu 21, gen presenilinu 1 (PS1) na chromozomu 14 a gen presenilinu 2 (PS2) na chromozomu 1²³. Biologické funkce presenilinů nejsou dosud známé. Předpokládá se, že PS1 usnadňuje štěpení APP nebo by mohl být přímo γ -sekterázou²⁶. Možná také interaguje s GSK3 β a stimuluje tak fosforylaci τ -proteinu²⁷.

Obecnými rizikovými faktory jsou vysoký věk, ženské pohlaví, zvýšený oxidační stres. Mezi další možné rizikové faktory se zařazují poranění hlavy, nižší vzdělání a kouření cigaret¹⁵.

3.2.4. Terapie Alzheimerovy choroby

Jelikož není zatím zcela známa etiologie nemoci, není ji možno léčit kauzálně. Léčba se proto alespoň zaměřuje na procesy již známé, jejichž ovlivněním lze zpomalit progresi nemoci a oddálit tak těžká stadia spojená se zhoršením kvality života a odkázáním na péči okolí²⁸.

3.2.4.1. Kognitiva

Jedná se o látky, které zlepšují funkci hlavně centrálního cholinergního systému. Řadí se mezi ně prekuzory acetylcholinu, inhibitory cholinesteráz a agonisté muskarinových a nikotinových receptorů²⁹.

a) Prekuzory acetylcholinu

Nejčastěji jsou užívány sojové lecithiny, které uvolňují cholin k syntéze acetylcholinu. Lecithin špatně prostupuje přes hematoencefalickou bariéru, proto je jeho efekt nedostatečný a samostatné užívání neopodstatněné²⁹.

b) Inhibitory cholinesteráz

IChE představují léky první volby v léčbě lehkých až středních forem AD. Jejich podávání je založeno na důkazech a je ověřeno mnoha kontrolovanými studiemi. Účinek spočívá v zablokování enzymů, které odbourávají v mozku důležitý neuromediátor acetylcholin, a tím prodlužují vazbu acetylcholinu na své receptory. Důležité je, aby centrální IChE dobře pronikaly hematoencefalickou bariérou do mozku a tam ovlivňovaly specifické formy cholinesteráz a byly dobře tolerovány²⁹.

IChE jsou chemicky nejednotné látky, které se mj. liší hlavně v tom, zda významně odbourávají nebo neodbourávají enzym BuChE¹⁷. U nás se momentálně z této skupiny léčiv využívají k terapii 3 látky:

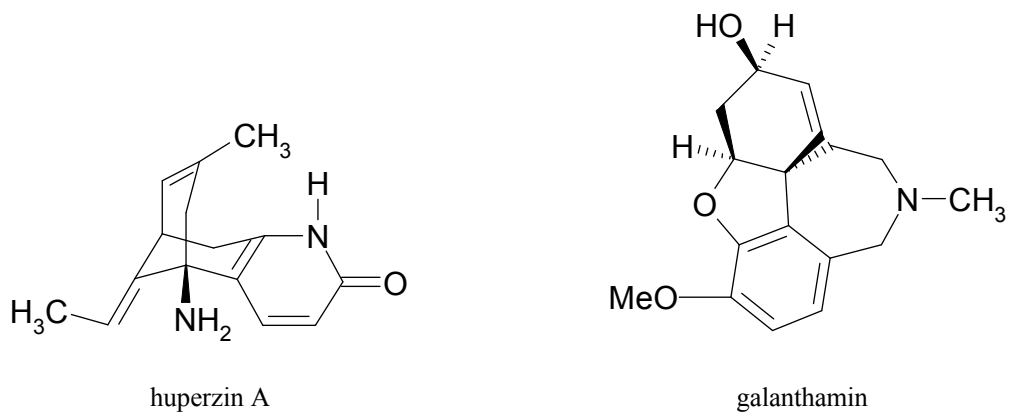
- Donepezil (Aricept) – působí jako selektivní inhibitor AChE s dlouhým poločasem, což umožňuje perorální podávání v jedné denní dávce.

- Rivastigmin (Exelon) – je cholinergní dualista, inhibuje AChE i BuChE, perorálně se podává 2 × denně.
- Galanthamin (Reminyl) – selektivně inhibuje AChE a navíc allostericky moduluje nikotinové receptory, jeho poločas je kratší, ovšem ve formě s postupným uvolňováním se podává 1 × denně²⁸.

Léčba IChE probíhá ve dvou fázích. Během úvodní eskalační fáze se postupně zvyšují dávky léčiva až do dosažení terapeutického účinku nebo maximálně tolerované terapeutické dávky. V této fázi může podávání IChE vést k akutním gastrointestinálním (GIT) nežádoucím účinkům, např. k nauce, zvracení, průjmům, nechutenství apod. V udržovací fázi léčby IChE se pak mohou objevit různé nežádoucí účinky neurologické (bolesti hlavy), svalové (křeče), kardiopulmonální (zpomalení srdeční činnosti) či ubývání na váze vlivem snížené chuti k jídlu³⁰.

Kontraindikací pro terapii IChE je vředová choroba gastroduodenální a těžší převodní poruchy srdeční¹⁷.

V Číně se již k léčbě AD využívá další přírodní IChE – huperzin A. Jedná se o alkaloid izolovaný z plavuně *Huperzia serrata* (*Lycopodiaceae*). Látka je silným reverzibilním inhibitorem centrální AChE. Vykazuje tak neuroprotektivní účinek, zlepšuje paměť, proces učení, snižuje také úzkost. Nežádoucí účinky terapie se mohou projevat jako nauce, pocení, rozmazané vidění. Intenzita vedlejších účinků je ovšem slabší než u galanthaminu⁶. Výhodou huperzinu A je delší působení oproti donepezilu či rivastigminu a rychlejší přestup přes hematoencefalickou bariéru a lepší biologická dostupnost při orálním podání než u ostatních IChE³¹. Struktura přírodních IChE huperzinu A a galanthaminu je uvedena na následujícím obrázku (Obr. 1).



Obr. 1: Struktury přírodních látek využívaných v terapii AD jako IChE

IChE mají největší vliv na zpomalení průběhu choroby. Předpokládá se, že tomu napomáhá zřejmě i to, že pravděpodobně snižují tvorbu β -amyloidu ovlivněním γ -sekretáz. Zlepšení kognitivních funkcí nad výchozí hodnoty měřitelné různými testy trvá obvykle půl roku až jeden rok. Poté se hodnoty vyrovnávají s původní hodnotou a postupně se snižují. Kromě příznivého vlivu na kognitivní funkce dokazuje mnoho klinických studií, že IChE zároveň pozitivně ovlivňují aktivity denního života i tzv. behaviorální a psychologické příznaky demence, především poruchy chování¹⁷.

c) Agonisté muskarinových a nikotinových receptorů

Jako přímý stimulátor acetylcholinergních receptorů se terapeuticky využívá pouze galanthamin²⁹. Jedná se o terciární alkaloid izolovaný z rostlin čeledi Amaryllidaceae a kromě reverzibilní selektivní inhibice AChE allostericky moduluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Tím potencuje produkci acetylcholinu a neurotransmisi zprostředkovanou těmito receptory³².

3.2.4.2. Inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému

V terapii se dosud využívá jediná látka této skupiny, a to memantin (Ebixa). Je určený především k léčbě středních až těžších stadií AD. Jeho podávání je podpořeno rozsáhlými klinickými studiemi, které zároveň potvrdily jeho pozitivní vliv na stabilizaci

stavu, kognitivní funkce a aktivity denního života. Tento účinek je navíc mnohem výraznější v kombinaci memantinu s IChE^{2,18,19,33}.

Memantin jako parciální inhibitor NMDA receptorů výrazně snižuje nadměrný influx vápenatých iontů do neuronů přes iontové kanály NMDA receptorů trvale aktivované zvýšenou koncentrací glutamátu, a tím omezuje excitotoxické působení na neurony. K jeho dalším pozitivním účinkům patří inhibiční vliv na proteinkinázu GSK3 β , která se podílí na spuštění degenerace neuronálního τ -proteinu²⁸. Perorálně se látka podává 2 \times denně a zpočátku se dávka titruje. Obecně je léčba memantinem dobře snášena, případné nežádoucí účinky se projevují jako příznaky excitace nebo přechodné halucinace či jiné psychotické symptomy^{11,34}.

3.2.4.3. Nootropika a další látky zvyšující mozkový metabolismus

U demencí včetně AD byl dokázán v mozkové kůře snížený neuronální metabolismus, zejména pokles oxidativního metabolismu glukózy a buněčné proteosyntézy, dále pak snížená perfúze a míra extrakce kyslíku z krve^{15,35}. Z toho důvodu se zjišťuje terapeutický účinek nootropních léčiv a dalších látek zvyšujících cerebrální metabolismus³⁶. Přestože jsou tyto látky v klinické praxi hojně využívány, doposud není jejich používání racionální, jelikož klinické studie neprokázaly výrazné ovlivnění průběhu AD. Proto se tato léčiva využívají pouze jako léčiva doplňková^{2,18,19}.

Jednotlivá nootropika se liší svými vlastnostmi. Piracetam (Nootropil) kromě vlivu na cerebrální metabolismus zlepšuje reologické vlastnosti krve. Pyritinol (Encephabol) napomáhá vychytávat volné kyslíkové radikály. Nicergolin (Sermion) ovlivňuje mikrocirkulaci v mozku a snižuje agregaci krevních destiček. Extractum ginkgo biloba (selektivní extrakt EGb 761 Tanakan, neselektivní extrakt Gingium) mimo nootropní působení vykazuje rovněž efekt vazoaktivní, antioxidační a antiagregační^{2,15,18,19}.

3.2.4.4. Další perspektivní látky a přístupy k léčbě Alzheimerovy choroby

a) Antioxidační látky

V patogenezi AD se mj. uplatňuje nadměrná tvorba volných kyslíkových radikálů, které následně způsobují lipoperoxidaci neuronální membrány, což urychluje apoptické děje. Látky, které jsou schopny vychytávat tyto radikály, se označují jako scavengery (zametače) volných kyslíkových radikálů a jsou používány jako doplněk k terapii IChE. Nejčastěji se užívá vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (kyselina askorbová), pyritinol, retinol a β -karoten, melatonin aj. Velké množství volných radikálů vzniká při odbourávání dopaminu, proto sem lze z tohoto hlediska zařadit rovněž inhibitor enzymu monoaminoxidázy B selegilin, navíc obsah tohoto enzymu se v mozkové tkáni zvyšuje s věkem, a to především u AD^{37,38}.

b) Nervové růstové faktory

U některých typů demencí včetně alzheimerovských byl prokázán nedostatek nervových růstových faktorů, které mají vliv na plasticitu a přežití neuronů, v embryonálním stadiu stimulují růst neuronů. Klinicky se využívá přípravek Cerebrolysin, hydrolyzát vepřových mozků, který obsahuje aminokyseliny a velmi krátké peptidy jako prekurzory tvorby nervových růstových faktorů. Přípravek musí být podáván v i. v. infuzích v opakujících se intervalech, což společně s ne zcela přesvědčivým efektem snižuje jeho použití^{15,29}.

c) Estrogenní substituce u postklimakterických žen

Za preventivní přístup proti rozvoji AD je považována estrogenní substituce u postklimakterických žen. Bylo totiž zjištěno, že postmenopauzální ženy bez hormonální substituce estrogeny mají vyšší riziko vývoje AD oproti ženám substituovaným³⁹⁻⁴¹. Jedním z vysvětlení může být to, že estrogenní hormony zvyšují uvolnění nervových růstových hormonů prostřednictvím svých receptorů v mozku, navíc také zlepšují

cerebrální mikrocirkulaci účinkem na hladké svalstvo cév. Preventivní podávání estrogenů však nebylo dosud prokázáno klinickými studiemi²⁹.

d) Jiné nadějně přístupné k terapii Alzheimerovy choroby

Z dalších nadějných přístupů jsou ve fázi klinického zkoušení některá nesteroidní antirevmatika, která by měla potlačovat sterilní zánět v oblastech akumulací β -amyloidu. Dále pak některá antidiabetika, jež by prostřednictvím PPAR- γ receptorů měla snižovat tvorbu β -amyloidu či přímo vakcinace lidským β -amyloidem₄₂^{17,29}.

3.2.4.5. Farmakoterapie poruch chování u alzheimerovských pacientů

K potlačení nevhodného chování u pacientů s AD se nejvíce využívají antipsychotika (neuroleptika). Někdy se podávají pouze jednorázově ke ztlumení akutního neklidu, jindy při přetrvávajících poruchách chování se podávají dlouhodobě. Preferována jsou antipsychotika II. generace, která mají oproti léčivům I. generace méně nežádoucích účinků, jež bývají vyvolány blokádou více receptorových systému. Nejčastěji se indikují léčiva tiaprid, melperon, risperidon či quetiapin.

Při výskytu deprese jsou nejužívanějšími léčivy antidepressiva III. generace, tj. selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI – citalopram, sertralin, escitalopram aj.), nebo antidepressiva IV. generace (venlafaxin, mirtazapin, milnacipran). Antidepressiva I. a II. generace nejsou vhodná pro anticholinergní působení, výjimkou je v terapii používaný trazodon¹³.

Při odsrtaňování poruch spánku je nevhodná medikace benzodiazepinovými hypnotiky, jelikož mohou zhoršovat kognitivní poruchu a působit sedativně i během dne. V praxi se používají nebenzodiazepinová hypnotika zolpidem a zopiklon. Tato léčiva by se měla podávat pouze krátkodobě. Při nutnosti dlouhodobého podávání je vhodnější doporučit s ohledem na povahu nemoci antidepressiva či atypická neuroleptika se sedativním účinkem⁹.

3.2.4.6. Nefarmakologické přístupy v terapii Alzheimerovy choroby

Velmi důležité je zaměřit se během terapie AD také na reedukační přístupy vzhledem k paměti, dalším kognitivním funkcím i aktivitám denního života – je potřeba s nemocnými procvičovat ty funkce, které ještě zůstaly zachovány. Neméně důležitá je edukace pečovateli pacientů. Správný přístup k nemocným totiž pomáhá snižovat mj. i výskyt neklidu^{11,13}.

3.2.5. Další látky potenciálně využitelné v terapii Alzheimerovy choroby jako inhibitory cholinesteráz

Jelikož se dosud jako nejúčinnější v terapii AD osvědčily IChE, logicky tak vzrůstá snaha o nalezení nových, ať už zcela přírodních či syntetických, látek působících tímto mechanismem. V posledních letech proto probíhá intenzivní screening mnoha látek ovlivňujících funkci AChE či BuChE. Často se výzkum potenciálních IChE opírá o látky již zavedené do terapie AD. Pozornost se upírá hlavně na různé deriváty nebo příbuzné rostlinné zdroje těchto sloučenin, nejčastěji alkaloidů. Ovšem zvyšuje se rovněž snaha o nalezení účinných substancí i mimo skupinu těchto látek.

3.2.5.1. Přírodní alkaloidní zdroje inhibitorů cholinesteráz

Po uvedení galanthaminu do klinické praxe se výzkum v oblasti inhibiční aktivity vůči AChE soustředil na rostlinné druhy čeledi Amaryllidaceae. Z mnoha izolovaných alkaloidů nakonec vykázal inhibiční účinek pouze galanthaminový a lykorinový typ. Nejsilněji pak působily sanguinin a 11-hydroxygalanthamin, které jsou až 10krát silnější inhibitory AChE, ale jejich limitujícím faktorem je dostupnost v přírodních zdrojích⁴².

Hlavními obsahovými látkami rodu *Sarcococca* čeledi Buxaceae jsou steroidní alkaloidy. Některé z nich byly rovněž testovány jako potenciální inhibitory cholinesteráz. Většina zkoumaných alkaloidů vykázala selektivní nebo silnější účinek vůči BuChE^{43,44}.

3.2.5.2. Přírodní nealkaloidní zdroje inhibitorů cholinesteráz

Dosud nejprozkoumanějšími v oblasti „nealkaloidní“ inhibice cholinesteráz jsou terpenoidy⁷. Jako kompetitivní inhibitory AChE působí některé monoterpeny, jež tvoří často hlavní složku esenciálních olejů. Terpenické ketony (např. (+)-pulegon) pak způsobují silnější inhibici oproti terpenickým alkoholům (např. (-)-menthol)⁴⁵. Tradičně se ke zlepšení paměti v některých oblastech světa využívá šalvěj (*Salvia* spp., Lamiaceae), u které byl inhibiční účinek potvrzen. Předpokládá se u ní synergický účinek složek silice, jelikož celkový extrakt působil silněji než jednotlivé monoterpeny⁴⁶. Také triterpenická kyselina ursolová izolovaná z *Origanum majorana* (Lamiaceae) vykazovala inhibiční efekt vůči AChE⁴⁷. Další perspektivní skupinou látek se zdají být kumariny – tento fakt potvrzují výsledky testů provedených s kumariny a furanokumariny izolovanými z rostlin rodu *Angelica*, *Murraya* či *Scopolia*⁴⁸⁻⁵⁰.

Ve snaze objevit další nové nealkaloidní IChE se někteří vědci zaměřili na testování látek vylučovaných mikroorganismy nebo živočichy. V této sféře nejlepší výsledky vykazali houby a mořští bezobratlí⁷.

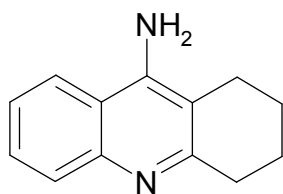
3.2.5.3. Syntetické zdroje inhibitorů cholinesteráz

Také výzkum v oblasti syntetických látek zaznamenal několik zajímavých výsledků. Na bázi klasických IChE je založena struktura huprinů, hybridních sloučenin spojujících molekulu takrinu a huperzinu A⁵¹. Takrin nejenže kompetitivně inhibuje AChE a interaguje s muskarinovými receptory, ale současně inhibuje i monoaminoxidázy (MAO). Převládající afinita vůči BuChE a závažná hepatotoxicita limituje jeho samostatné použití^{52,53}. Hupriny prokázaly vyšší afinitu k HuAChE než jednotlivé molekuly, z nichž jejich struktura vychází. Pokusy na myších ukázaly vyšší selektivitu k AChE než BuChE a také mírnější vedlejší účinky. Ačkoli u myší působily krátkodobě, předpokládá se, že u lidí by biologický poločas mohl dosahovat vyšších hodnot⁵¹.

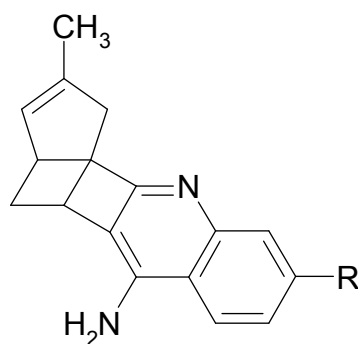
Další velmi perspektivní látka byla syntetizována v roce 1997. Tento benzazepinový derivát – TAK-147 – zlepšoval v preklinických testech na potkanech

cholinergní deficit, vykazoval dobrý průnik do CNS, vyšší selektivitu vůči AChE a mírné vedlejší účinky na periférii. Tato sloučenina rovněž zvyšovala monoaminoergní neurotransmisi a energetický metabolismus. Navíc v koncentraci inhibující aktivitu AChE působila na centrální cholinergní neurony podobně jako nervové růstové faktory. Všechny tyto vlastnosti předurčují tuto látku jako velmi perspektivní molekulu, která by mohla působit preventivně proti vzniku AD nebo rozvoj této choroby zastavit^{54,55}.

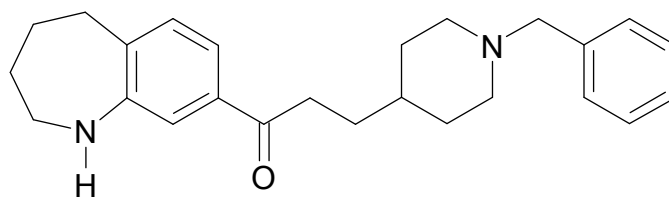
Novým typem IChE by pak mohly být AChE-serotoninové transportérové a AChE-MAO duální inhibitory. Spojením rivastigminu a fluoxetinu do jedné molekuly vznikl předpoklad, že by tato sloučenina kromě cholinergní aktivity mohla zamezit depresím, které postihují pacienty trpící AD. V pokusech s potkany zlepšila látka označená RS-1259 po delší dobu oproti donepezilu jejich krátkodobou paměť, zvýšila koncentraci acetylcholinu v hippokampu a serotoninu v CNS, ačkoli v *in vitro* studii RS-1259 působil 3 – 4krát slaběji než donepezil⁵⁶. Druhý typ duálních inhibitorů představuje sloučenina TV-3326, která je odvozena od rasagilinu, selektivního MAO-B inhibitoru, a rivastigminu⁵⁷. Tato molekula by měla spojovat neuroprotektivní účinek a zlepšení kognitivního deficitu doprovázející AD. U potkanů, králíků a opic působil TV-3326 selektivní inhibicí MAO-A i MAO-B v mozku, tím se zvýšila koncentrace serotoninu v CNS, který pak působil antidepresivně⁵⁸. V pokusech na buněčných kulturách TV-3326 rovněž stimuloval α -sekretázu ke štěpení APP⁵⁹. Obr. 2 uvádí struktury výše zmíněných syntetických látek, které by mohly být potenciálně využívány jako nové IChE.



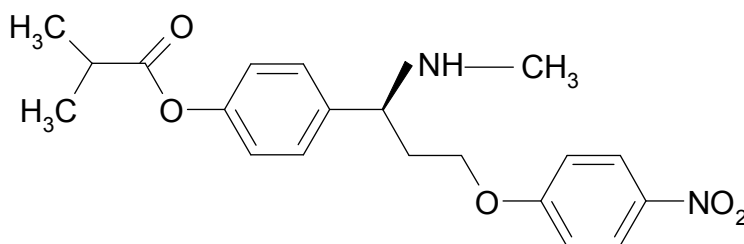
takrin



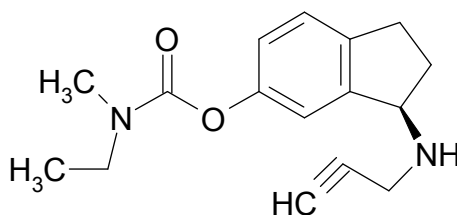
R = Cl huprin Y
R = F huprin Z



TAK-147



RS-1259



TV-3326

Obr. 2: Struktury potenciálních syntetických IChE

3.3. *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. (Rutaceae) a další druhy rodu *Zanthoxylum*

Čeleď Rutaceae zahrnuje asi 150 rodů a až 1800 druhů rostlin rozšířených v tropických, subtropických i mírných klimatických oblastech. Některé druhy slouží pouze pro okrasné účely, jiné poskytují jedlé plody nebo užitkové dřevo⁶⁰. Jelikož je čeleď druhově velmi rozmanitá, člení se na několik nižších podčeledí. Dělení je však velmi nejednotné. Podčeledi Aurantioideae a Rutoideae se ovšem vyskytují ustáleně zřejmě ve všech klasifikacích⁶¹. Podčeleď Rutoideae dále zahrnuje dílčí kmeny, které pak sjednocují několik druhů rostlin dle různých společných kritérií.

3.3.1. Taxonomické zařazení *Zanthoxylum nitidum*

Říše: Plantae (rostliny)

Podříše: Tracheobionta (cévnaté rostliny)

Nadoddělení: Spermatophyta (semenné rostliny)

Oddělení: Magnoliophyta (krytosemenné rostliny)

Třída: Magnoliopsida (dvouděložné rostliny)

Řád: Sapindales (mýdelníkotvaré)

Čeleď: Rutaceae (routovité)

Podčeleď: Rutoideae

Rod: *Zanthoxylum* (žlutodřev)

Druh: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC⁶².



Obr. 3: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC⁶³.

3.3.2. Morfologický popis *Zanthoxylum nitidum*

Zanthoxylum nitidum je morfologicky rozličná rostlina. Obvykle se jedná o vytrvalý šplhavý či vzpřímený keř s plstnatými větvemi a trny. Lichožpeřené listy tvoří 1 – 5 párů vejčité eliptických lístků na vrchu kožovitých, ze spodu někdy srstnatých, dorůstající do délky 3 – 15 cm a šířky 1,5 – 8 cm. Květy vyrůstají v terminálních nebo úžlabních latách či chocholičnatých vrcholících, jsou malé, jednopohlavné, žlutozelené barvy, tvořené čtyřlaločným kalichem a 4 korunními lístky. Plodem je jedlý měchýřek obsahující kulovitá černá lesklá 4 mm velká semena^{64,65}.

3.3.3. Výskyt rostlin rodu *Zanthoxylum*

Obecně keře či liány rodu *Zanthoxylum* rostou v tropických a subtropických oblastech celého světa. Druh *Z. nitidum* je možno nalézt volně růst v rozlehlých oblastech od Indie po severní Queensland v Austrálii, hlavně však v jihovýchodní Číně^{64,66}.

3.3.4. Použití rostliny *Zanthoxylum nitidum* v lidovém léčitelství

Více jak tisíc let je kořen *Z. nitidum* využíván v tradiční čínské medicíně jako protizánětlivý a analgetický prostředek⁶⁷. Nejvíce se uplatňuje při bolestech zubů, žaludku, horečce, revmatismu, parézách a rovněž jako pesticid či insekticid. Plod se používá při trávicích potížích, kašli, kolikovitém zvracení, průjmech, parézách, dále jako koření a stimulační přísada nebo jako pesticid. V některých oblastech lidé žvýkají větvičky či samotnou kůru větví jako prostředek při bolesti zubů a zánětu dásní nebo přidávají extrakt z rostliny do zubních past^{68,69}.

3.3.5. Sekundární metabolity izolované ze *Zanthoxylum nitidum*

Mezi nejvýznamnější biologicky aktivní látky izolované z kořenů, větví nebo celé rostliny *Z. nitidum* patří izochinolinové a chinolinové alkaloidy. Dosud bylo z tohoto druhu izolováno přibližně 50 alkaloidů, které dělíme do několika strukturních typů:

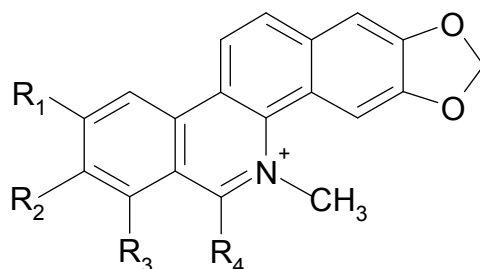
3.3.5.1. Benzo[c]fenanthridinový typ

Benzofenanthridinové alkaloidy se řadí do skupiny izochinolinových alkaloidů, jejichž biosyntéza vychází z aminokyselin fenylalaninu či tyrosinu⁷⁰. Struktury těchto látek se vzájemně velmi podobají. Základ molekuly tvoří tetracyklický skelet, který je substituován nejčastěji methoxylovými, methyldioxidovými nebo hydroxylovými skupinami. Podle charakteru základního skeletu se dále rozlišují kvartérní a terciární alkaloidy.

Kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy izolované ze *Z. nitidum* jsou charakterizovány methylsubstitucí na atomu dusíku v poloze 5 základního tetracyklického skeletu, která udělí molekule kladný náboj. Z tohoto rostlinného druhu se dosud podařilo izolovat významné alkaloidy sanguinarin a chelerythrin a dále pak jejich deriváty nitidin, 8-methoxynorchelerythrin a 8-methoxysanguinarin⁷¹⁻⁷³.

Terciární benzofenanthridinové alkaloidy druhu *Z. nitidum* jsou neutrální molekuly bez kladného náboje. Dusík v molekule základního skeletu je nesubstituovaný, jak to dokazují struktury dekarinu, rhoifolinu A, 8-methoxyisodekarinu a norchelerythrinu⁷²⁻⁷⁵.

Isoarnottianamid, arnottianamid a integriamid^{72,74} se liší od předchozích látek tím, že je jejich základní skelet rozštěpený, a to v místě kruhu obsahujícím atom dusíku. Struktury výše jmenovaných alkaloidů izolovaných ze *Z. nitidum* jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 4).



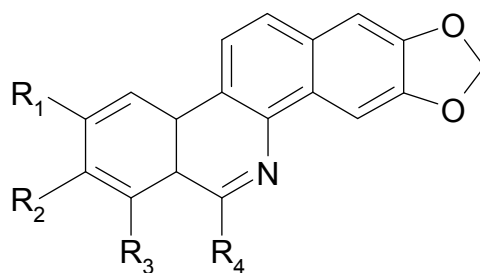
R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃, R₄ = H chelerythrin

R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = H, R₄ = H nitidin

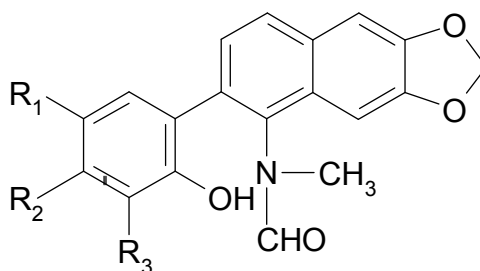
R₁ = H, R₂ + R₃ = OCH₂O, R₄ = H sanguinarin

R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = H, R₄ = OCH₃ 8-methoxynorchelerythrin

R₁ = H, R₂ + R₃ = OCH₂O, R₄ = OCH₃ 8-methoxysanguinarin



$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3, R_4 = H$ dekarin
 $R_1 + R_2 = OCH_2O, R_3 = OCH_3, R_4 = H$ rhoifolin A
 $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH, R_4 = OCH_3$ 8-methoxyisodekarin
 $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OCH_3, R_4 = H$ norchelerythrin

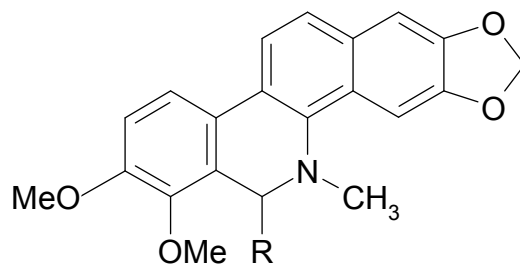


$R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = H$ isoarnottianamid
 $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OCH_3$ arnottianamid
 $R_1 + R_2 = OCH_2O, R_3 = H$ integriamid

Obr. 4: Struktury alkaloidů benzo[c]fenanthridinového typu

3.3.5.2. Dihydrobenzo[c]fenanthridinový typ

Dihydrobenzofenanthridinové alkaloidy se rovněž řadí do skupiny izochinolinových alkaloidů. Obvykle se jedná o látky odvozené od struktury sanguinarinu či chelerythrinu. Jejich molekula je částečně hydrogenovaná, terciární dusík základního skeletu nese opět methylovou skupinu. V rámci celé řady fytochemických studií zabývajících se izolací alkaloidů ze *Z. nitidum* byly izolovány a strukturně popsány následující dihydrobenzofenanthridinové alkaloidy^{71,72,74-77} – dihydrochelerythrinyl-8-acetaldehyd, dihydrochelerythrin, 8-(1'-hydroxyethyl)dihydrochelerythrin, 8-hydroxydihydrochelerythrin, 8-methoxydihydrochelerythrin, 8-(2'-cyklohexanon)-dihydrochelerythrin, oxyavicin, oxynitidin, oxychelerythrin, 5,6-dihydro-6-methoxynitidin, 6-acetyldihydrochelerythrin a 6-acetyl-8-O-demethyldihydrochelerythrin. Struktury těchto alkaloidů jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 5).




R = CH₂CHO dihydrochelerythrinyl-8-acetaldehyd

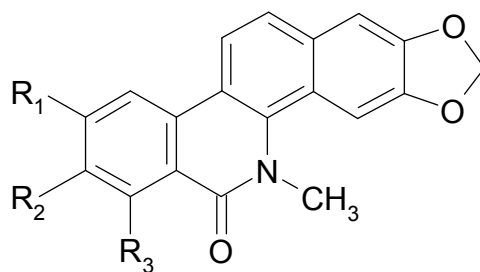
R = H dihydrochelerythrin

R = OH 8-hydroxydihydrochelerythrin

R = OCH₃ 8-methoxydihydrochelerythrin

R =  8-(2'-cyklohexanon)dihydrochelerythrin

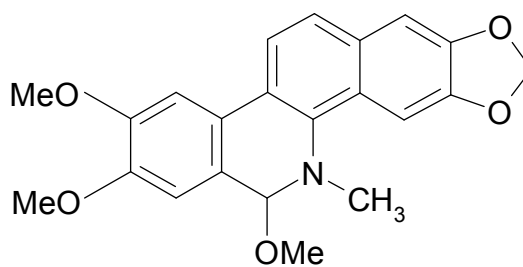
R = CH(OH)CH₃ 8-(1'-hydroxyethyl)dihydrochelerythrin



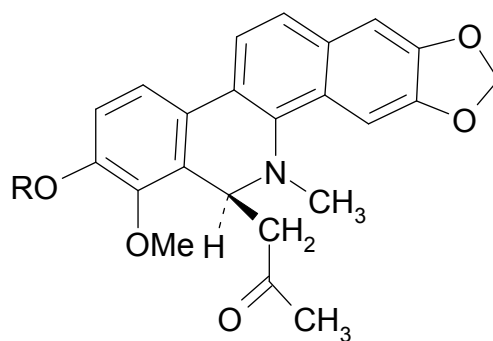
R₁ + R₂ = OCH₂O, R₃ = H oxyavicin

R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = H oxynitidin

R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃ oxychelerythrin



5,6-dihydro-6-methoxynitidin

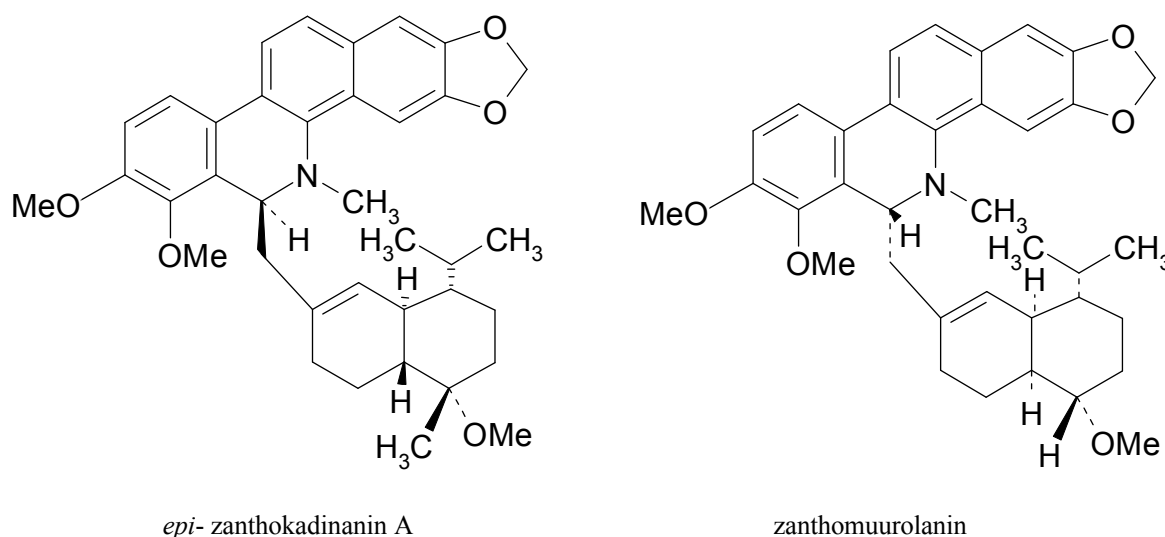


R = OCH₃ 6-acetonyldihydrochelerythrin

R = H 6-acetyl-8-O-demethyldihydrochelerythrin

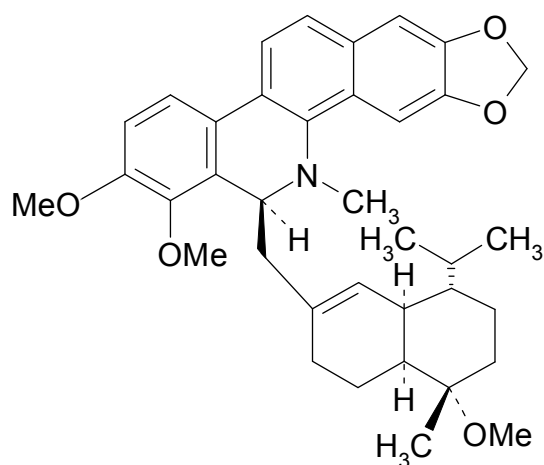
Obr. 5: Struktury alkaloidů dihydrobenzo[c]fenanthridinového typu

V práci z roku 2008 se Yang a kol. zaměřili na studium nepolární frakce získané extrakcí kmenové kůry *Z. nitidum* a podařilo se jim izolovat dosud nepublikované dihydrobenzofenanthridinové alkaloidy zanthomurolanin, *epi*-zanthomurolanin, zanthokadinanin A, zanthokadinanin B a *epi*-zanthokadinanin B⁷⁸. V roce 2009 pak navíc popsali další nový alkaloid tohoto charakteru, a to *epi*-zanthokadinanin A⁷⁴. Struktury uvedených nepolárních alkaloidů zobrazuje následující obrázek (Obr. 6).

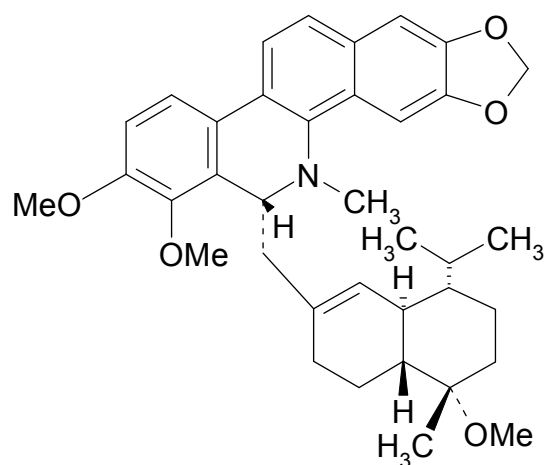


epi- zanthokadinanin A

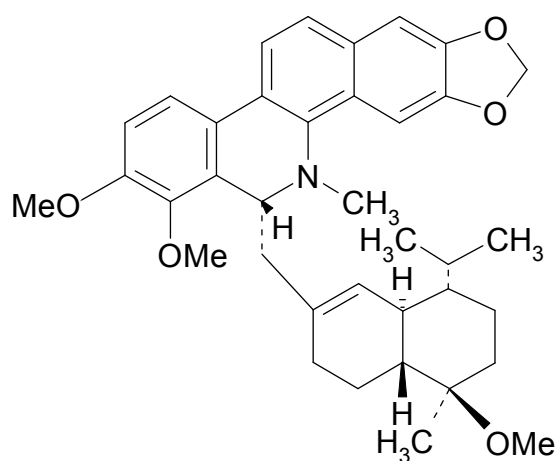
zanthomurolanin



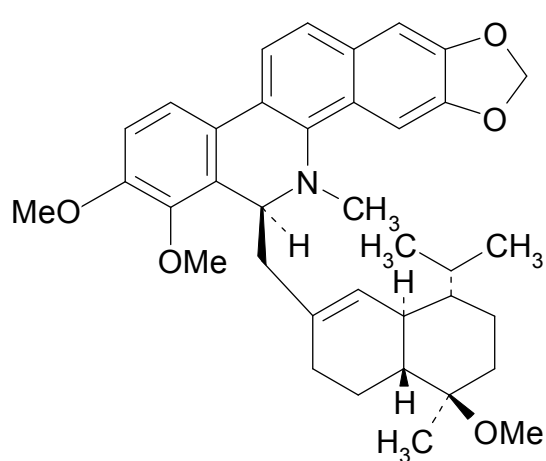
epi-zanthomurolanin



zanthokadinanin A



zanthokadinanin B

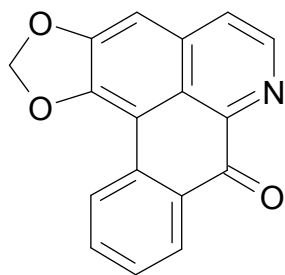


epi-zanthokadinanin B

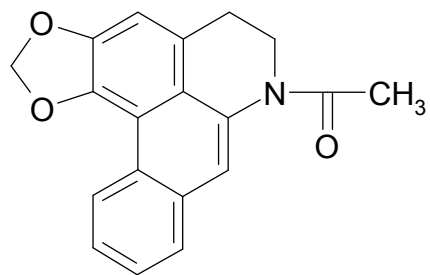
Obr. 6: Struktury nepolárních alkaloidů dihydrobenzo[c]fenanthridinového typu

3.3.5.3. Aporfinový typ

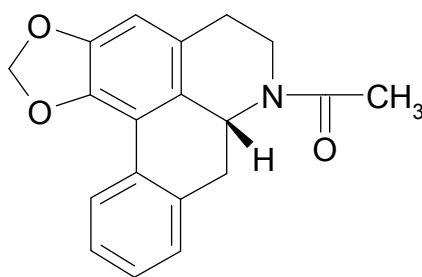
Z izochinolinových alkaloidů odvozených od aporfinu byly ze *Z. nitidum* izolovány liriodenin, *N*-acetyldehydroanonain, *N*-acetylanonain^{72,74}. Struktury těchto látek uvádí obr. 7.



liriodenin



N-acetyldehydroanonain

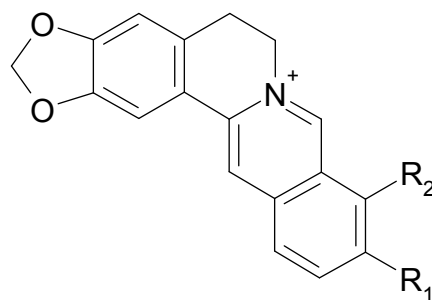


N-acetylanonain

Obr. 7: Struktury alkaloidů aporfinového typu

3.3.5.4. Protoberberinový typ

Studie alkaloidů druhu *Z. nitidum* z roku 2006 mj. popisuje izolaci kvartérních sloučenin koptisinu a berberrubinu⁷² (Obr. 8).



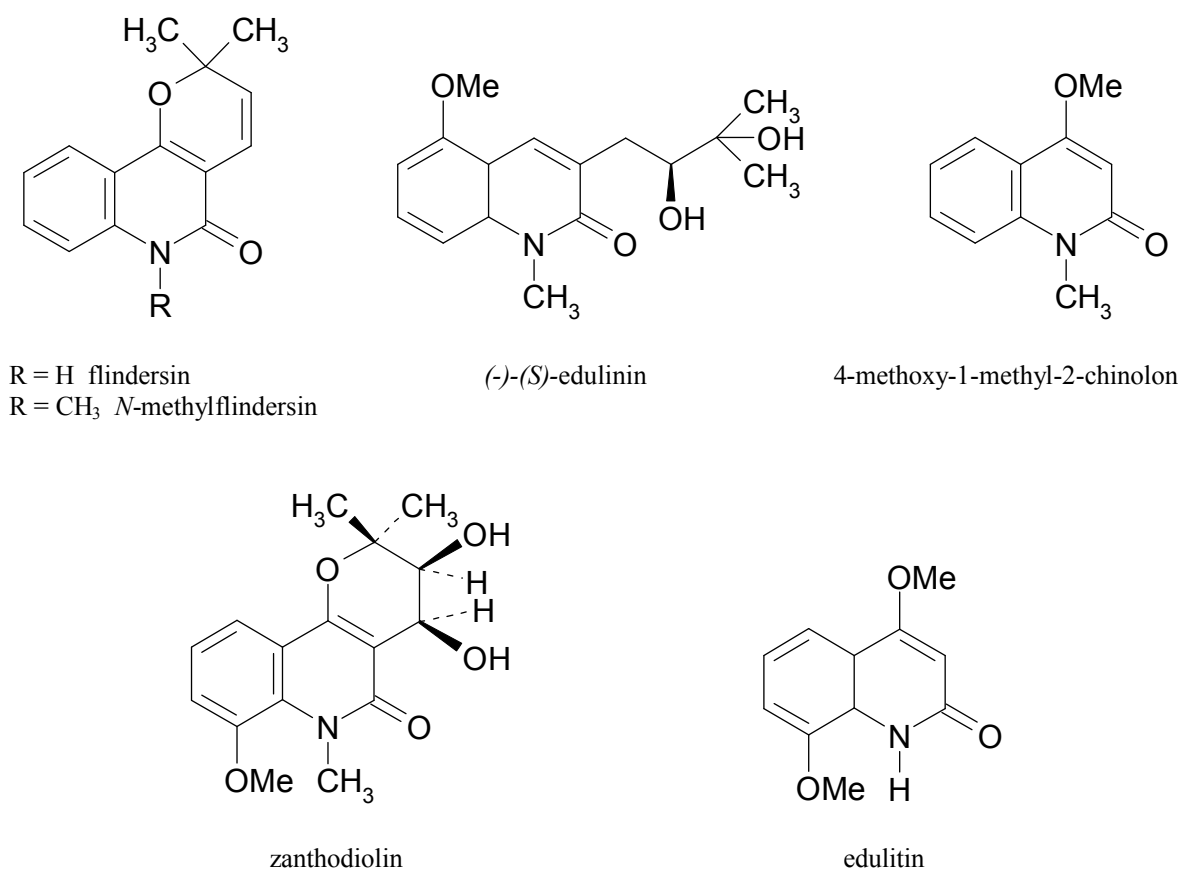
$R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$ koptisin

$R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$ berberrubin

Obr. 8: Struktury alkaloidů protoberberinového typu

3.3.5.5. 2-chinolonový typ

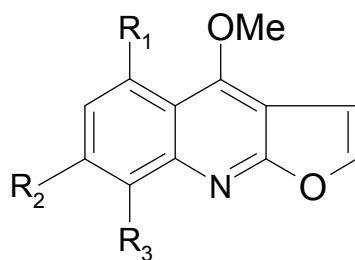
Biosyntéza chinolinových alkaloidů vychází z aminokyseliny tryptofanu a terpenických jednotek⁷⁰. Tento typ látek není v druhu *Z. nitidum* příliš častý, přesto se z něj podařilo izolovat 2-chinolonové alkaloidy flindersin, 4-methoxy-1-methyl-2-chinolon⁷⁴, *N*-methylflindersin⁷⁵, (-)-(*S*)-edulinin, zanthodiolin a edulitin⁷⁹. Struktury těchto alkaloidů jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 9).



Obr. 9: Struktury alkaloidů 2-chinolonového typu

3.3.5.6. Furochinolinový typ

Skimmianin, γ -fagarin, diktamnin, 5-methoxydiktamnin^{72,74,75,77,79} a haplopin⁷⁹ se rovněž řadí k chinolinovým alkaloidům. Oproti příbuzným 2-chinolonovým derivátům je izolace těchto látek ze *Z. nitidum* popisována častěji. Obr.10 popisuje struktury uvedených furochinolinových alkaloidů.

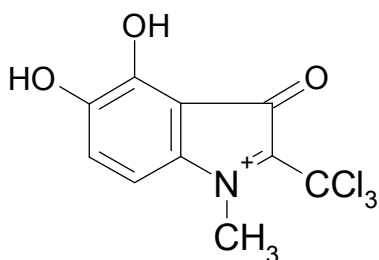


$R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$ diktamnin
 $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OCH_3$ γ -fagarin
 $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OCH_3$ skimmianin
 $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = H$ 5-methoxydiktamnin
 $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3$ haplopin

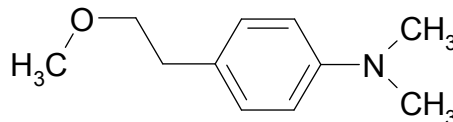
Obr. 10: Struktury alkaloidů furochinolinového typu

3.3.5.7. Další alkaloidy

4,5-dihydroxy-1-methyl-3-oxo-2-(trichlormethyl)-3*H*-indolium chlorid a 4-(2-methoxyethyl)-*N,N*-dimethylbenzenamin jsou alkaloidy, jež byly izolovány v roce 2007 jako do té doby neidentifikované látky z druhu *Z. nitidum*⁸⁰. Jejich struktury uvádí obr. 11.



4,5-dihydroxy-1-methyl-3-oxo-2-(trichlormethyl)-3*H*-indolium chlorid



4-(2-methoxyethyl)-*N,N*-dimethylbenzenamin

Obr. 11: Struktury dalších alkaloidů izolovaných ze *Z. nitidum*

3.3.6. Další obsahové látky

Kromě alkaloidů popisují některé práce izolaci dalších obsahových látek, a to zejména kumarinů, lignanů⁸¹, benzenoidů a steroidů⁸².

V práci publikované roku 2011 popisují Chen a kol. extrakci a izolaci mj. 6 benzenoidů – (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methyl-2-enyloxy)benzaldehydu, (*E*)-methyl 3-{4-[(*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyloxy]fenyl}akrylátu, (*Z*)-methyl 3-{4-[(*E*)-4-hydroxy-3-

methylbut-2-enyloxy]fenyl}akrylátu, 4-(3-methylbut-2-enyloxy)benzoové kyseliny, 4-hydroxybenzaldehydu a syringaldehydu; 3 kumarinů – aeskuletin dimethyletheru, 6,7,8-trimethoxykumarinu a skopoletinu; 4 lignanů – (+)-episesaminu, (+)-sesaminu, piperitol- 3,3-dimethylallyletheru a sesaminonu⁷⁵.

3.3.7. Biologická aktivita alkaloidů izolovaných ze *Zanthoxylum nitidum*

V posledních letech byly extrakty rostliny podrobeny několika přínosným studiím, které se zaměřovaly na různé farmakologické účinky. Nejvýznamnějšími se nakonec ukázaly účinky antivirové a antifungální⁷⁷, protinádorové⁸³, protizánětlivé a analgetické⁷¹. Novější studie se zaměřují rovněž na zkoumání možného uplatnění obsahových látek této rostliny při terapii AD^{79,84}.

3.3.7.1. Antivirová a antifungální aktivita

V práci z roku 2006 se Yang a Chen poprvé zaměřili na studium *in vitro* antivirových účinků benzofenanthridinových a chinolinových alkaloidů proti viru hepatitidy B. Významný inhibiční efekt vůči sekreci HBsAg byl zjištěn u chinolinových alkaloidů 5,6-dihydro-6-methoxynitidinu a 5-methoxydiktamninu. Tyto alkaloidy inhibovaly sekreci antigenu při koncentraci 0,2 $\mu\text{mol/ml}$ z 43,3 % a 49,3 %, zatímco pozitivní standard lamivudin inhiboval při koncentraci 1,0 $\mu\text{mol/ml}$ z 29,6 %. Oba tyto alkaloidy lze považovat za silnější inhibitory nežli použitý standard⁷⁷.

HBsAg je povrchový antigen vnějšího obalu viru hepatitidy B (HBV). V krvi se objevuje časně před propuknutím příznaků onemocnění (1 – 10 týdnů). U chronických forem zánětu jater přetrvává tento antigen déle než 6 měsíců v krvi pacientů. Přítomnost HBsAg tedy prokazuje nákazu HBV a je detekovatelný ve všech tělních tekutinách⁸⁵.

Další slibný účinek prokázaly skimmianin a 5-methoxydiktamnin vůči HBeAg. V koncentraci 0,2 $\mu\text{mol/ml}$ inhibovaly sekreci tohoto antigenu z 31,9 % a 43,2 % oproti standardu lamivudinu, který inhiboval tento antigen při koncentraci 1,0 $\mu\text{mol/ml}$ z 35,4 %⁷⁷.

Přítomnost HBeAg v séru pacienta je považována za důkaz aktivní replikace virové DNA v hepatocytech. Průkaz HBeAg je považován za alternativní ukazatel přítomnosti virové DNA HBV⁸⁶.

Z těchto výsledků vyplývá, že 5-methoxydiktamnin si zaslouží další podrobnější zkoumání jakožto potenciální inhibitor sekrece HBsAg a HBeAg⁷⁷.

Ve stejné práci se Yang a Chen zabývali rovněž antifungální aktivitou vůči fytopatogenní houbě *Pyricularia oryzae*. Za projev účinku zkoumaných látek byla považována inhibice růstu hyfových vláken nebo deformace konidií. Jako pozitivní standard byl použit rhizoxin s MIC 1,56 µg/ml. Diktamnin, γ-fagarin a 5-methoxydiktamnin prokázaly antimitotickou a antifungální aktivitu při MIC 6,25 µg/ml. Skimmianin projevil slabou inhibici až při MIC 25,00 µg/ml a 5,6-dihydro-6-methoxynitidin byl inaktivní⁷⁷.

3.3.7.2. Protizánětlivá a analgetická aktivita

V roce 2006 byla uveřejněna studie, která porovnává protizánětlivé a analgetické účinky několika alkaloidů izolovaných ze *Z. nitidum* – nitidinu, dihydrochelerythrinu, oxyavicinu, 8-methoxychelerythrinu a 8-hydroxydihydrochelerythrinu.

Antinociceptivní efekt alkaloidů byl zkoumán na myších, kterým byla aplikována intraperitoneálně 0,8% kyselina octová. Zánětlivý otok pro posuzování protizánětlivého účinku byl vyvolán aplikací 0,04 ml xylenu do pravého ucha myši. Aplikovaly se dvě dávky roztoků alkaloidů – 10 mg/ml a 40 mg/kg. Výsledky jednotlivých látek byly porovnávány s kontrolní myší a účinkem hydrokortisonu v dávce 20 mg/kg. Nejsilnější efekt jak analgetický, tak protizánětlivý vyvolal nitidin. Autoři článku předpokládají, že na tomto výsledku se podílí přítomnost vazby C=N ve struktuře nitidinu oproti ostatním testovaným sloučeninám⁷¹.

3.3.7.3. Protinádorová aktivita

Yang a kol. se v roce 2009 soustředili na studium protinádorových účinků látek izolovaných ze *Z. nitidum* vůči vybraným buněčným liniím. Zaměřili se hlavně na buněčné linie MCF-7 (lidský prsní adenokarcinom), NCI-H460 (nemalobuněčný karcinom plic) a SF-268 (glioblastom). Jako pozitivní standard použili aktinomycin D. Nejsilnější cytotoxický efekt vyvolal liriodenin, dalším potenciálním alkaloidem pro léčbu nádorů by mohl být také skimmianin⁷⁴. Výsledky této studie jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 1):

Tab. 1: *In vitro* cytotoxická aktivita skimmianinu a liriodeninu vůči vybraným buněčným liniím⁷⁴

Látka	IC ₅₀ (μg/ml) ^a		
	MCF-7	NCI-H460	SF-268
Skimmianin	8,03 ± 0,49	> 13	> 13
Liriodenin	3,19 ± 0,29	2,38 ± 0,35	2,19 ± 0,11
Aktinomycin D ^b	0,127 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,020 ± 0,009

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

3.3.7.4. Anticholinesterázová aktivita

Inhibitory cholinesteráz již v praxi prokázaly významný efekt v terapii AD. Některé z nich byly získány z přírodních zdrojů, a proto probíhají různé screeningové studie rostlinných extraktů za účelem objevení dalších potenciálních IChE.

Studie uveřejněná roku 2011 popisuje silný inhibiční efekt celkového alkaloidního extraktu kořene *Z. nitidum* vůči aktivitě AChE. Zjištěná IC₅₀ extraktu byla 10,7 ± 0,4 μg/ml, zatímco referenční látka fysostigmin vykazoval IC₅₀ 0,013 ± 0,002 μg/ml. Následné chromatografické čištění směsi různých látek a další měření inhibiční aktivity vůči AChE vedlo k získání alkaloidu se silným inhibičním účinkem – skimmianinu (IC₅₀ 8,6 ± 0,7 μg/ml). Mezi získanými látkami byly též alkaloidy s obdobnou strukturou jako skimmianin – diktamnín, γ-fagarin a haplopin. Ani jeden z nich ovšem nevykázal

významnou inhibiční aktivitu vůči AChE. Autoři článku tento výsledek vysvětlují tím, že přítomnost methoxy skupiny na C-7 furochinolinového skeletu významně zesiluje inhibiční aktivitu. Z toho vyplývá, že methoxy skupina na C-7 je důležitým faktorem pro AChE inhibiči⁷⁹.

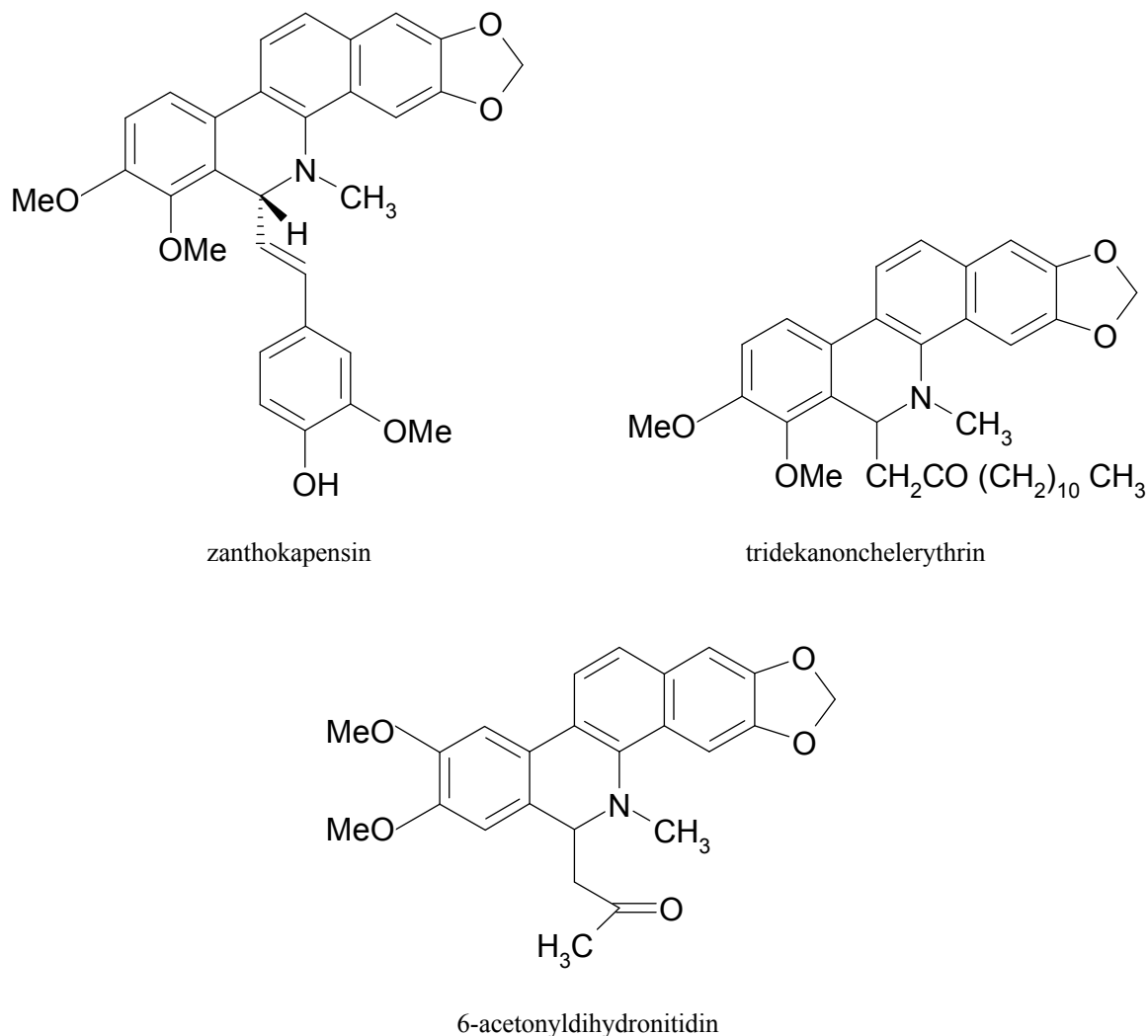
3.3.8. Další zástupci rodu *Zanthoxylum* a biologická aktivita jejich sekundárních metabolitů

3.3.8.1. Zanthoxylum capense

Dalším zajímavým druhem patřícím do rodu *Zanthoxylum* je rostlina *Z. capense*, která se vyskytuje přirozeně v oblasti Zimbabwe, Jižní Afriky a Mozambiku⁸⁷. Zdejší léčitelé používají odvar z kořenů při hadím uštknutí a odvar z kořenové kůry k léčbě tuberkulózy, paralýzy a ke zmírnění bolesti zubů⁸⁸.

V roce 2012 byla uveřejněna práce, která se zabývala izolací účinných látek z kořene této rostliny, jež byly následně testovány *in vitro* na antibakteriální aktivitu. Vedle 2-arylbenzofuranových neolignanů se podařilo izolovat a určit strukturu několika alkaloidů, mezi kterými autoři popsali zcela nový dihydrobenzofenantridinový alkaloid zanthokapensin. Získané látky – neolignany zanthokapensol a zanthokapensat, benzofenantridinové alkaloidy zanthokapensin, dekarin, norchelerythrin, dihydrochelerythrin, 6-acetonyldihydrochelerythrin, tridekanonchelerythrin a 6-acetonyldihydronitidin – byly podrobeny *in vitro* testu na antibakteriální účinek vůči G+ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 a 25923) a *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) a vůči G- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) a *Escherichia coli* (ATCC 25922). Jako referenční látky byly použity kanamycin a gentamicin. Jako jediná byla zaznamenána signifikantní aktivita vůči bakterii *Staphylococcus aureus* 6538, ostatní bakterie byly k testovaným látkám rezistentní. Nejsilnější antibakteriální aktivitu vykázal 6-acetonyldihydronitidin s MIC 12,5 µg/ml, zatímco kanamycin působil při MIC 1,56 µg/ml a gentamicin při 0,19 µg/ml. Zanthokapensat, zanthokapensin a dekarin pak

působily při MIC 25,0 $\mu\text{g/ml}$. Ostatní látky vykázaly vůči *S. aureus* 6538 velmi slabou antibakteriální aktivitu⁸⁹. Struktury látek izolovaných v této studii uvádí obr. 12.



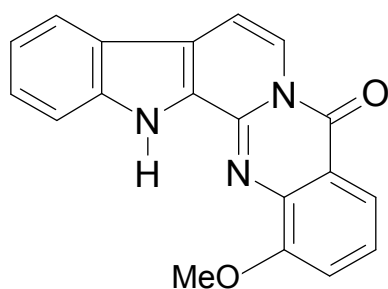
Obr. 12: Struktury vybraných alkaloidů *Z. capense*

3.3.8.2. *Zanthoxylum integrifoliolum*

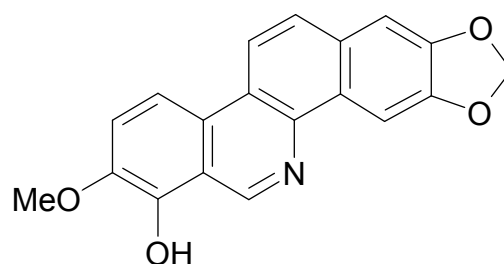
Z. integrifoliolum je stálezelený strom rostoucí na severu Filipín a na taiwanském ostrově Lanyu⁹⁰. Jeho kůra byla využívána domorodci k léčbě hadího uštknutí a sloužila též jako zdroj antiagregačních látek⁹¹.

Chen a kol. uveřejnili v roce 2005 práci, ve které se jako první zaměřili na biologicky aktivní látky v kořenové kůře tohoto stromu. Podařilo se jim izolovat tři nové alkaloidy – 7,8-dehydro-1-methoxyrutaekarpin, isodekarin a 8-O-

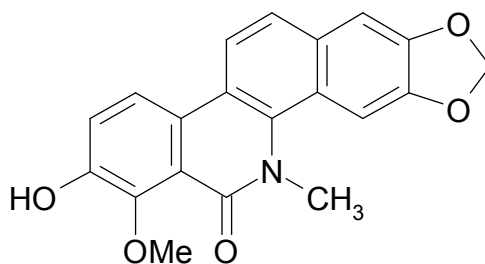
demethyloxychelerythrin (Obr. 13). Dále izolovali již známé benzofenanthridinové alkaloidy norchelerythrin, oxychelerythrin, dekarin, dihydrochelerythrinylacetaldehyd, 6-acetonyldihydrochelerythrin a arnottianamid, indolopyridochinazolinové alkaloidy rutaekarpin a 1-hydroxyrutaekarpin, furochinolinové alkaloidy γ -fagarin a skimmianin. Dále v extraktu stanovili lignany a triterpenoidy.



7,8-dehydro-1-methoxyrutaekarpin



isodekarin



8-O-demethyloxychelerythrin

Obr. 13: Struktury nových alkaloidů izolovaných ze *Z. integrifolium*

Získané čisté látky poté Chen a kol. podrobili *in vitro* zkouškám na cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím P-388 (lymfatická leukemie) a HT-29 (lidský kolorektální karcinom) za použití mithramycinu jako pozitivní referenční látky. Za významný výsledek byly považovány hodnoty $ED_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/ml}$. Vůči P-388 působil nejsilněji dihydrochelerythrinylacetaldehyd, vůči HT-29 skimmianin⁹². Výsledky testu shrnuje následující tabulka (Tab. 2):

Tab. 2: Cytotoxická aktivita alkaloidů izolovaných z kořenové kůry *Z. integrifolium* vůči P-388 a HT-29 buněčným liniím⁹²

Látky	ED ₅₀ (μg/ml) ^a	
	P-388	HT-29
7,8-dehydro-1-methoxyrutaekarpin	3,88 ± 0,42	8,54 ± 0,82
Isodekarin	4,71 ± 0,56	10,3 ± 1,1
8-demethyloxychelerythrin	4,41 ± 0,52	6,17 ± 0,70
Norchelerythrin	2,32 ± 0,23	6,56 ± 0,56
Oxychelerythrin	3,25 ± 0,44	5,48 ± 0,46
Dekarin	4,27 ± 0,56	8,79 ± 0,73
Dihydrochelerythrinylacetaldehyd	1,15 ± 0,22	4,08 ± 0,34
6-acetonyl-dihydrochelerythrin	3,77 ± 0,45	5,39 ± 0,42
Rutaekarpin	10,5 ± 0,9	33,6 ± 2,9
1-hydroxyrutaekarpin	3,72 ± 0,36	7,44 ± 0,86
γ-fagarin	3,58 ± 0,39	22,5 ± 2,6
Skimmianin	2,62 ± 0,28	0,15 ± 0,02
Arnottianamid	7,28 ± 0,63	4,74 ± 0,41
Mithramycin ^b	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

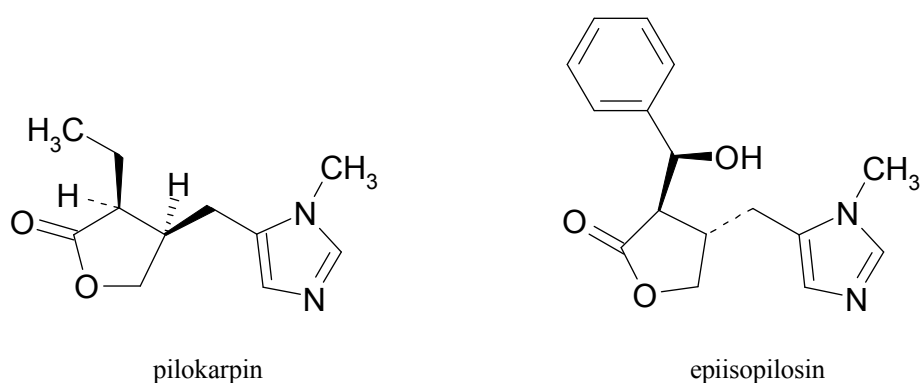
3.4. Další významné rody podčeledi *Rutoideae*

3.4.1. Rod *Pilocarpus*

Velice zajímavým rodem z hlediska obsahových látek i farmaceutického využití je rod *Pilocarpus*, který zahrnuje 17 druhů keřů a stromů, jež patří mezi přirozenou floru tropických oblastí od jižního Mexika přes střední Ameriku až k Argentině. 14 druhů roste na území Brazílie, kde tyto rostliny nazývají *Jaborandi*⁹³.

Ačkoli jsou tyto rostliny známé po dlouhou dobu, výzkumy týkající se jejich obsahových látek ustrnuly u nejvýznamnější z nich – pilokarpinu. Pilokarpin je imidazolový alkaloid obsažený výhradně v rostlinách tohoto rodu⁹⁴. Pro svou

parasympatomimetickou aktivitu na muskarinových receptorech se dosud využívá v terapii glaukomu. Aplikuje se pouze lokálně ve formě očních kapek, jelikož při systémové aplikaci by mohl vyvolat závažné poškození srdečních funkcí. Mechanismus účinku spočívá v tom, že po aplikaci látky do oka dojde k mióze a následně se rozšíří odtokové cesty komorové vody, tím se sníží nitrooční tlak. Mezi další využívané účinky patří podpora salivace a perspirace při nedostatečné funkci příslušných žláz a také podpora tvorby slz⁹⁵. Mezi nejvýznamnější zdroj pilokarpinu patří listy druhu *P. microphyllus*. Ostatní druhy obsahují pilokarpinu méně⁹⁶. U *P. spicatus* nebyl pilokarpin identifikován vůbec. Mezi další izolované alkaloidy patří hlavně různé deriváty imidazolu, které se velmi podobají pilokarpinu, obvykle se jedná o deriváty či isomery pilokarpinu⁹³. Farmakologická a toxikologická aktivita byla zkoumána především u epiisopilosinu. Bylo zjištěno, že ve vysokých dávkách stimuluje parasympatický systém podobně jako pilokarpin, ačkoli jeho LD₅₀ je oproti pilokarpinu vyšší, tudíž by měl být epiisopilosin mnohem méně toxický⁹⁷. Studie týkající se pilokarpinu a rostlin rodu *Pilocarpus* se zabývají především možnostmi, jak pozitivně ovlivnit syntézu pilokarpinu rostlinou k získání vyššího zastoupení tohoto alkaloidu oproti ostatním minoritně syntetizovaným látkám. Struktura pilokarpinu a epiisopilosinu je uvedena na následujícím obrázku (Obr. 14).



Obr. 14: Struktury imidazolových alkaloidů rodu *Pilocarpus*

3.4.2. Rod *Agathosma*

Dalším zajímavým rodem je rod, jehož hlavní zástupci *Agathosma betulina* a *Agathosma crenulata* (dříve byl tento rod nazýván *Barosma*) jsou vytrvalé keře s dřevnatými větvíčkami a malými tužšími listy se siličnými žlázkami, tvořící typický tečkovaný efekt. Oba tyto druhy patří do přirozené květeny Jižní Afriky⁹⁸. V některých oblastech oba druhy slučují pod jednotné označení „Buchu“. Léčivé účinky těchto rostlin byly po dlouhá léta tradičně využívány zejména v Kapské oblasti. Lidé je používaly při kašli, chřipce, nachlazení, horečce, dále jako antiseptický prostředek při infekcích ledvin a močového traktu, při hematurii nebo prostatitidě. Rovněž nacházely uplatnění při choleře a jiných zažívacích potížích nebo se užívaly ke zmírnění revmatismu, dny a poúrazových potíží^{99,100}. Také v kosmetice byl využit jejich antibakteriální, antifungální, repelentní nebo deodorační efekt¹⁰¹. Mnohá z těchto využití byla nakonec zakotvena v různých lékopisech, kam se „Buchu“ zařadilo jako diuretikum, antiseptikum močového traktu, dále jako prostředek k terapii arthritidy, cystitidy, průjmu, nadýmání, ledvinových infekcí, nausey, revmatismu a různých poranění. „Buchu“ se dále využívá jako přírodní repelentní prostředek a táborníci si jím mnohdy potírají lůžka, aby tak odehnali mravence a komáry¹⁰². Přes veškerá tradiční uplatnění se v dnešní době rostliny rodu *Agathosma* nejvíce využívají v potravinářském a kosmetickém průmyslu pro jejich ovocnou chuť a vůni. Nejvíce připomínají aroma černého rybízu⁹⁸.

V roce 1987 byla provedena Campbellem a jeho kolegy velká screeningová studie zabývající se obsahem alkaloidů v nadzemních částech 42 různých taxonů včetně rodu *Agathosma*, ovšem paradoxně nejvýznamnější dva druhy tohoto rodu – *A. betulina* a *A. crenulata* – testovány nebyly. Přesto se podařilo z jiných druhů izolovat alkaloidy halfordamin a skimmianin¹⁰³. Práci, které se zabývají obsahem alkaloidních látek v těchto druhích rostlin, je poskrovnu. Většina fytochemických studií se totiž soustředí na zkoumání esenciálních olejů uložených především v listech. Tyto látky velmi pestrého složení se pak zřejmě podílejí na biologických účincích těchto rostlin, jež se využívají po mnoho

generací, ačkoli jejich účinky nejsou dosud v mnoha případech ověřeny klinickými studii⁹⁸.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Všeobecné postupy

4.1.1. Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím přečištěna předestilováním. Nejprve byl zachycen předeček (asi 5 %, většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých asi 90 % rozpouštědla.

Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých skleněných nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při 40 °C za sníženého tlaku.

4.1.2. Chromatografie

4.1.2.1. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena systémem gradientové eluce na oxidu hlinitém neutrálním. Suspenze adsorbentu v rozpouštědle byla nalita do chromatografické kolony obvyklým způsobem. Na povrch sloupce byl nanesen vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla.

4.1.2.2. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna v systému normálních komor, které byly nasyceny mobilní fází. Sycení komor trvalo 30 minut. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.2. Materiál a vybavení

4.2.1. Rozpouštědla

Benzin, p.a. (Penta)

Diethylether, p.a. (Penta)

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

Chloroform, p.a. (Penta)

n-Hexan, p.a. (Penta)

4.2.2. Chemikálie

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

Hydroxid sodný, p.a. (Penta)

Jodid draselný, p.a. (Penta)

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

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

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

4.2.3. Chemikálie a materiál použité ke stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

4.2.3.1. Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich)

10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich)

0,1M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

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

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Eserin (Sigma-Aldrich)

4.2.3.2. Materiál

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma. Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.2.4. Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.2.5. Chemikálie a materiál pro stanovení antioxidační aktivity

2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál (Sigma-Aldrich)

Kvercetrin (Sigma-Aldrich)

Trolox (Sigma-Aldrich)

4.2.6. Přístroj použitý pro stanovení antioxidační aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.2.7. Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera¹⁰⁴

- slouží k detekci alkaloidů a dalších sloučenin obsahujících v molekule vázaný dusík

- *roztok A* byl připraven rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody

- *roztok B* byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody

- *zásobní roztok* byl získán smísením roztoků A a B v poměru 1:1

- *činidlo* pro analýzu bylo připraveno rozpuštěním 5 ml kyseliny vinné v 50 ml vody a 5 ml zásobního roztoku

4.2.8. Chromatografické adsorbenty

A1: Oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii neutrální, Acros Organics, Brockmann I 50 – 200 μm , deaktivovaný 6 % vody

A2: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii, tloušťka vrstvy 0,2 mm

4.3. Příprava sumárního extraktu ze *Zanthoxylum nitidum*

4.3.1. Původ drogy

Sušená drcená droga byla dodána komerčním prodejcem Pragon s.r.o. (Praha, Česká republika). Potvrzení pravosti vzorku bylo provedeno doc. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Vzorek drogy byl uložen v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

4.3.2. Příprava ethanolového a alkaloidního extraktu

9,6 kg drogy, tvořené drcenými sušenými dřevnatými částmi rostliny, bylo extrahováno na vodní lázni pod zpětným chladičem 137 l 95% ethanolu. Získaný extrakt hnědé sirupovité konzistence byl zahuštěn na poloprovodní vakuové odparce (Heidolph Instruments; Laborota 20 Control), k němu bylo následně přidáno 5 l vody a odpařen zbytek ethanolu. Ke zbylému odparku bylo přidáno 1,2 l 2% kyseliny chlorovodíkové a směs byla přefiltrována přes polyamidovou plachetku a následně přes křemelinu pomocí vývěvy.

6,3 l získaného filtrátu bylo upraveno na pH 9 – 10 přidávkem 10% roztoku uhličitanu sodného a následně vytřepáno 4 × 2,4 l diethyletheru za účelem odstranění

nepolárních částic a tuků z vodné části. Vodná fáze byla následně znovu vytřepána 3 × 2,0 l chloroformu.

Zbývá vodná fáze byla poté převedena 50% roztokem hydroxidu sodného na pH 12 – 13 a vytřepána 3 × 2,2 l diethyletheru a 3 × 2,4 l chloroformu.

Odpařením rozpouštědel z jednotlivých organických výtřepků a vysušením v exsikátoru byly získány čtyři výtřepky:

- výtřepok A – pH 9 – 10, diethylether: 15,58 g
- výtřepok B – pH 9 – 10, chloroform: 8,60 g
- výtřepok C – pH 12 – 13, diethylether: 0,40 g
- výtřepok D – pH 12 – 13, chloroform: 1,59 g

Pozn.: V této diplomové práci byl zpracován výtřepok A. Výtřepok D byl analyzován kolegyní Lenkou Markovou v rámci její diplomové práce.

4.3.3. Sloupcová chromatografie výtřepku A ze *Zanthoxylum nitidum*

15,58 g výtřepku A bylo rozpuštěno v malém množství mobilní fáze ($\text{CHCl}_3 + \text{Benzin} = 35:65$) a nanášeno obvyklým způsobem na kolonu Al_2O_3 a chromatografováno za účelem získání čistých alkaloidů.

Jednotlivé frakce shodných alkaloidů byly spojovány na základě průběžně prováděné tenkovrstvé chromatografie.

Průběh a výsledky sloupcové chromatografie jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. 3, Tab. 4).

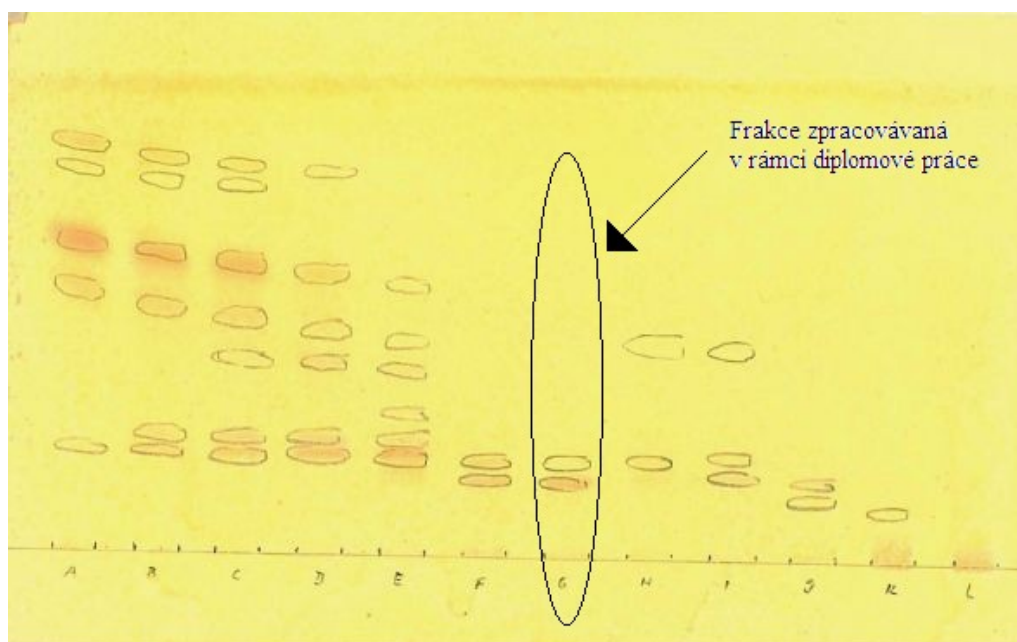
Tab. 3: Sloupcová chromatografie výtřepku A ze *Z. nitidum*

Označení vzorku	Výtřepok A, pH 9 – 10, Et ₂ O
Hmotnost a popis vzorku	15,58 g, hnědá pevná hmota
Druh a množství adsorbentu	Oxid hlinitý neutrální, 50 – 200 µm, 500 g, deaktivovaný 6 % vody
Vrstva s extraktem	5,5 × 5 cm
Dělicí vrstva	5,5 × 30 cm
Frakce (ml) / doba toku (min.)	100 ml / 15 min.
Mrtvý objem	500 ml

Tab. 4: Výsledky sloupcové chromatografie

Č. frakce	Označení frakce	Eluční systém	Popis	Hmotnost odparku
1 – 32	/	CHCl ₃ +Benzin (35:65)	bezbarvý roztok	/
33 – 55	/	CHCl ₃ +Benzin (40:60)		/
56 – 63	/	CHCl ₃ +Benzin (45:55)		/
64 – 71	A	CHCl ₃ +Benzin (45:55)	tmavěhnědá sirupovitá konzistence	0,127 g
72 – 76	B	CHCl ₃ +Benzin (45:55)		0,178 g
77 – 95	C	CHCl ₃ +Benzin (50:50)		0,517 g
96 – 99	D	CHCl ₃ +Benzin (50:50)		0,111 g
100 – 103	E	CHCl ₃ +Benzin (60:40)		0,528 g
104 – 106	F	CHCl ₃ +Benzin (70:30)		0,464 g
107 – 109	G	CHCl ₃ +Benzin (70:30)		0,231 g
110 – 112	H	CHCl ₃ +Benzin (70:30)		0,253 g
113 – 124	I	CHCl ₃ +Benzin (80:20)		0,573 g
125	J	CHCl ₃ +Benzin (80:20)		0,292 g
126	K	CHCl ₃ +Benzin (100:0)		1,653 g
127	L	CHCl ₃ +EtOH (90:10)		2,138 g

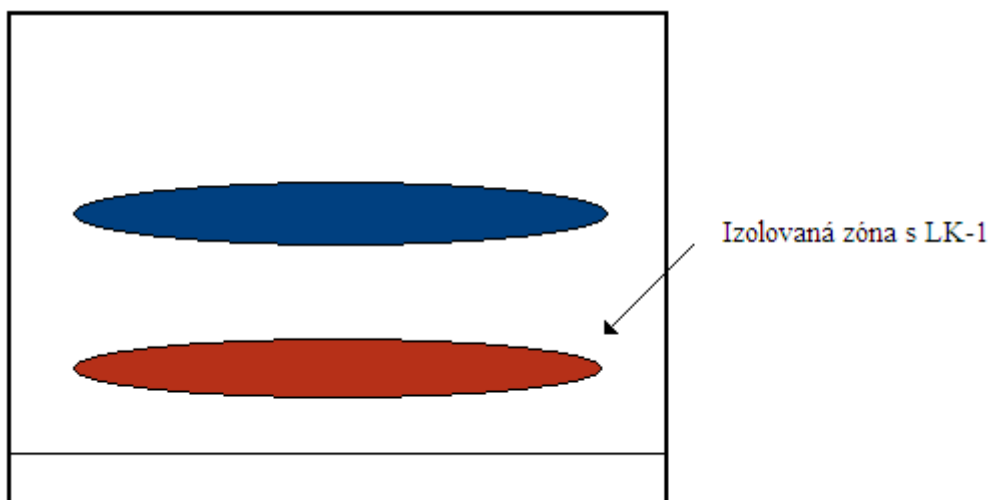
Po odpaření rozpouštědel a vysušení byly všechny frakce podrobeny souhrnné tenkovrstvé chromatografii s elučním systémem CHCl₃+Benzin (80:20). Výsledek znázorňuje obr. 15.



Obr. 15: Souhrnná TLC alkaloidních frakcí získaných sloupcovou chromatografií výtřepku A ze *Z. nitidum* (adsorbent A2, dráha vyvíjení 8,5 cm, CHCl_3 +Benzin = 80:20, vyvíjeno 1×, detekce Dragendorffovým činidlem dle Muniera)

4.3.4. Zpracování frakce G

0,231 g červenohnědé hmoty bylo rozpuštěno v chloroformu a podrobena preparativní tenkovrstvé chromatografii na tenkých vrstvách SiO_2 , vyvíjení jednotlivých desek probíhalo v chloroformu vždy dvakrát. Na základě UV detekce byla z desek vypreparována spodní zóna (Obr. 16). Stacionární fáze byla následně promyta chloroformem a přefiltrována přes vrstvu Al_2O_3 , aby došlo k odstranění mechanických nečistot. Po odpaření chloroformu byl filtrát podroben krystalizaci za snížené teploty ze směsi chloroform – hexan. Vzniklé krystalky byly zdekantovány, přečištěny v ethanolu a vysušeny v exsikátoru. Takto získané žluté krystalky čisté látky o hmotnosti 0,065 g byly uloženy pod označením LK-1.



Obr. 16: Preparativní tenkovrstvá chromatografie frakce G

4.4. Určení struktury izolované látky

4.4.1. MS analýza

Hmotnostní spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI⁺). Látka byla rozpuštěna v methanolu LC-MS.

4.4.2. NMR analýza

NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499.9 MHz pro ¹H a 125.7 MHz pro ¹³C jádra. ¹³C NMR spektra byla měřena v 5mm SW širokopásmové sondě, ¹H a všechna ²D spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Měření byla prováděna v deuteriochloroformu při 25 °C.

Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k vnitřnímu standardu (hexamethyldisilan; 0,04 ppm, v ¹H spektrech) nebo k signálu solventu (76,99 ppm, v ¹³C spektrech). (Dr. M. Kurfürst, Ph.D., Ústav chemických procesů, AV ČR, Praha).

4.5. Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity alkaloidu

4.5.1. Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37 °C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

4.5.2. Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta¹⁰⁵. Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) obsahujícím 150mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrům (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrům.

4.5.3. Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (IC₅₀)

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)¹⁰⁶. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí

v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz: galanthaminem (IC_{50} HuAChE = $1,71 \pm 0,065 \mu\text{M}$, HuBuChE = $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, HuBuChE $>1000 \mu\text{M}$), eserinem (IC_{50} HuAChE = $0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, HuBuChE = $0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$).

I (inhibice) byla počítána dle vzorce $\%I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.6. Stanovení antioxidační aktivity získaného alkaloidu (EC_{50})

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC_{50}), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetrinem $EC_{50} = 11,11 \pm 0,25 \mu\text{M}$ a troloxem $EC_{50} = 20,45 \pm 1,31 \mu\text{M}$.

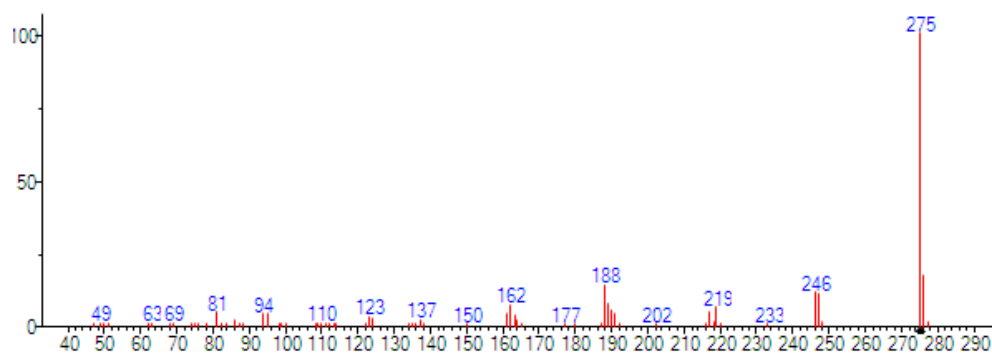
5. VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byla izolovaná látka identifikována jako liriodenin.

5.1. Strukturní analýza liriodeninu

5.1.1. MS studie liriodeninu

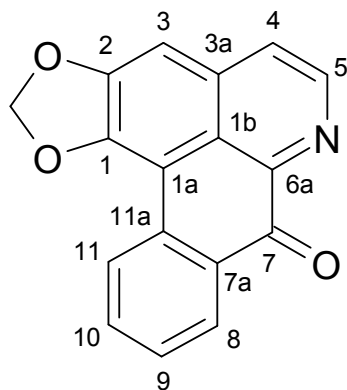
EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 275 (100); 247 (20); 246 (21); 219 (10); 217 (8); 202 (1); 188 (25); 162 (10).



Obr. 17: EI-MS spektrum liriodeninu

5.1.2. NMR studie liriodeninu

Struktura byla určena na základě interpretace ^1H a ^{13}C NMR spekter a jejich porovnání s údaji v literatuře¹⁰⁷.

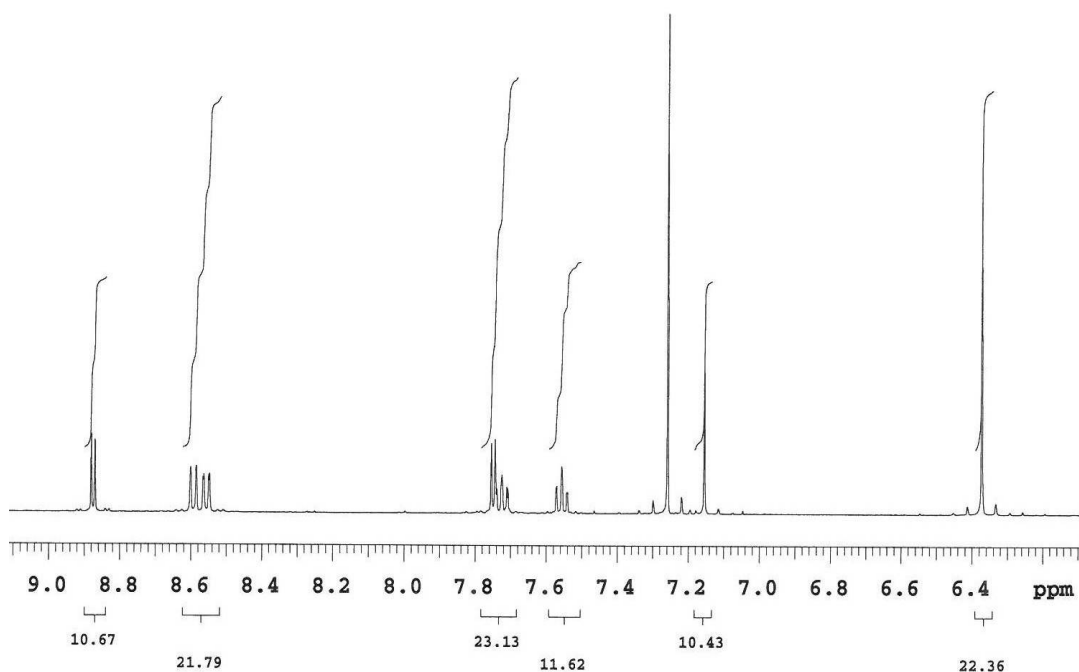


Obr.18: Struktura liriodeninu

5.1.2.1. ^1H NMR spektrum liriodeninu

^1H NMR (CDCl_3 , 25°C):

6.37 s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$; 7.19 s, 1H, H-3; 7.57 t ($^3J_{\text{H}}=7.8$ Hz), 1H, H-9; 7.76 t ($^3J_{\text{H}}=8.1$ Hz), 1H, H-10; 7.77 d ($^3J_{\text{H}}=5.1$ Hz), 1H, H-4; 8.58 d ($^3J_{\text{H}}=7.8$ Hz), 1H, H-8; 8.65 d ($^3J_{\text{H}}=7.8$ Hz), 1H, H-11; 8.89 d ($^3J_{\text{H}}=5.1$ Hz), 1H, H-5.

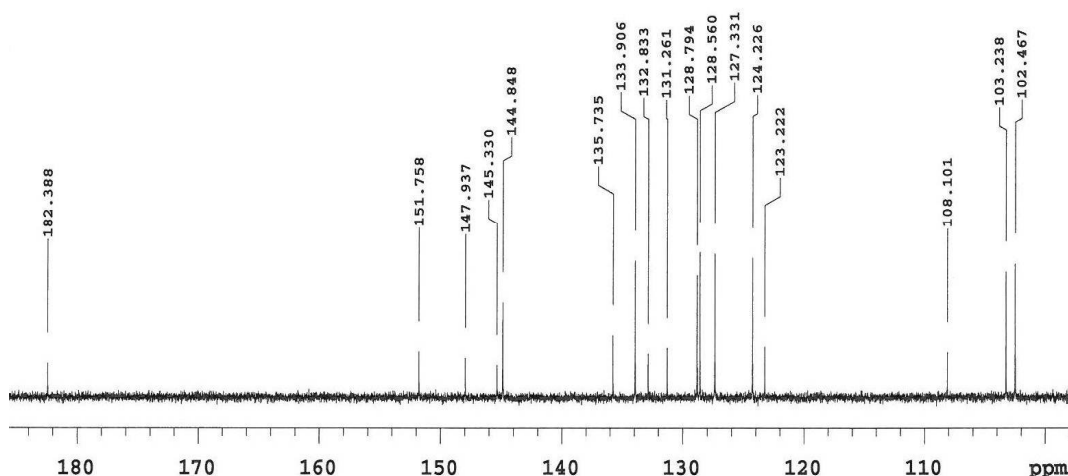


Obr. 18: ^1H -NMR spektrum liriodeninu

5.1.2.2. ^{13}C NMR spektrum liriodeninu

^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C):

102.4 (- OCH_2O -); 103.3 C-3; 108.4 C-1a; 123.3 -1b; 124.2 C-4; 127.4 C-11; 128.6 C-8;
128.9 C-9; 131.4 C-7a; 132.9 C-11a; 133.9 C-10; 135.8 C-6a; 145.0 C-5; 145.5 C-3a;
147.9 C-1; 151.8 C-2; 182.4 C-7.



Obr. 19: ^{13}C -NMR spektrum liriodeninu

5.2. Inhibiční aktivita vůči HuAChE a HuBuChE

Izolovaný alkaloid byl testován na inhibiční aktivitu vůči humánní erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 5).

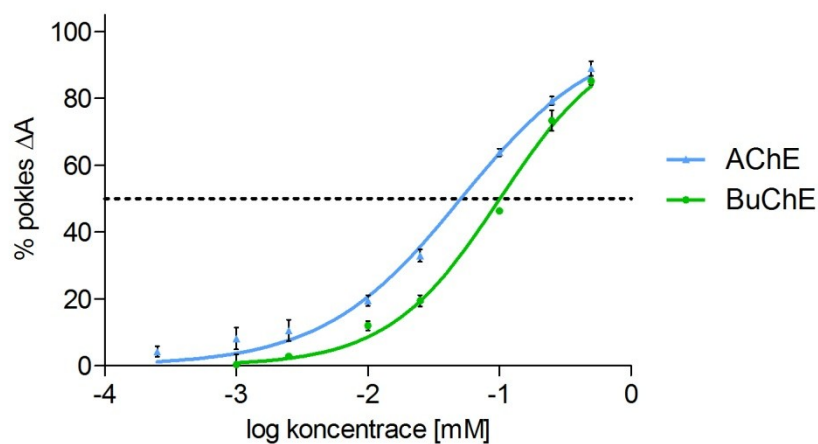
Tab. 5: *In vitro* inhibiční aktivita izolovaného alkaloidu vůči HuAChE a HuBuChE

Látka	IC_{50} (μM) ^a	
	HuAChE	HuBuChE
Liriodenin	$51,07 \pm 3,23$	$101,10 \pm 5,31$
Galanthamin ^b	$1,71 \pm 0,065$	$42,30 \pm 1,30$
Huperzin A ^b	$0,033 \pm 0,001$	>1000
Eserin ^b	$0,063 \pm 0,001$	$0,130 \pm 0,004$

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

Inhibiční křivka liriodeninu



5.3. Antioxidační aktivita

Získaný alkaloid byl testován na antioxidační aktivitu. Výsledky této studie jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 6).

Tab. 6: Antioxidační aktivita izolovaného alkaloidu (DPPH test)

Látka	EC ₅₀ (μM) ^a
Liriodenin	> 1000
Kvercetrin ^b	11,11 ± 0,25
Trolox ^b	20,45 ± 1,31

^a Každé měření bylo opakováno dvakrát

^b Referenční látka

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Rychlý vývoj vědy a techniky, zahrnující také oblast medicíny, výrazně zvyšuje životní úroveň lidí, zlepšuje kvalitu zdravotnické péče, a tím sekundárně přispívá k prodlužování života. Avšak čím se lidé dožívají vyššího věku, tím roste mj. prevalence neurodegenerativních chorob, mezi něž se řadí i Alzheimerova choroba. S terapií AD jsou úzce spjaty inhibitory AChE a v posledních letech také BuChE, jelikož byla potvrzena účast jinak minoritní BuChE na patologických procesech, a to zejména s postupující progresí onemocnění⁴. IChE přispívají ke zpomalení rozvoje nemoci pozitivním vlivem na kognitivní i behaviorální funkce. Přestože dosud v praxi využívané IChE donepezil, rivastigmin a galanthamin vykazují dobré klinické výsledky, se zvyšujícím se počtem nemocných AD roste úsilí o nalezení nových látek, jež by tato léčiva terapeuticky převyšovala a byla přijatelnější z hlediska vedlejších účinků. Uvedení galanthaminu izolovaného z *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) do terapie AD významně zvýšilo zájem o testování dalších látek přírodního původu.

Předmětem této diplomové práce bylo získat alkaloidní extrakt z rostliny *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae), chromatografickými metodami izolovat alespoň jeden alkaloid v čisté formě a následně ho podrobit strukturní analýze a testování na biologickou aktivitu.

Izolovaná látka byla na základě MS a NMR analýzy a porovnání dat s literaturou identifikována jako liriodenin. Ten se řadí do skupiny izochinolinových alkaloidů oxoaporfinového typu. Vyskytuje se v mnoha rodech různých čeledí, ale jeho zastoupení v nich bývá obvykle nízké¹⁰⁸. Liriodenin byl izolován mj. z *Annona foetida*, *A. salzmannii*, *Guatteria hispida* a *Guatteropsis friesiana* a dalších rodů z čeledi Annonaceae a je považován spolu s příbuznými oxoaporfinovými alkaloidy za chemotaxonomický znak této čeledi¹⁰⁹⁻¹¹².

Liriodenin byl testován na inhibiční aktivitu vůči humánní erytrocytární AChE a sérové BuChE Ellmanovou spektrofotometrickou metodou s použitím 5,5'-dithiobis-2-

nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako referenční látky byly použity galanthamin, huperzin A a eserin. Liriodenin vykázal hodnotu IC_{50} vůči HuAChE $51,07 \pm 3,23 \mu\text{M}$ a vůči HuBuChE $101,10 \pm 5,31 \mu\text{M}$, zatímco hodnoty IC_{50} standardů byly u galanthaminu $1,7 \pm 0,065 \mu\text{M}$ (HuAChE) a $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$ (HuBuChE), u huperzinu A $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ (HuAChE) a $> 1000 \mu\text{M}$ (HuBuChE), u eserinu $0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$ (HuAChE) a $0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$ (HuBuChE). Z těchto výsledků vyplývá, že liriodenin vykazuje relativně dobrou inhibiční aktivitu vůči AChE, vůči BuChE působil slaběji.

Antiacetylcholinesterázová aktivita liriodeninu byla poměrně nedávno studována také v práci Mollataghiho a kol., kteří jej izolovali z rostliny *Beilschmiedia alloiophylla* (Lauraceae). Také oni použili Ellmanovu metodu a v rámci jejich studie naměřili IC_{50} vůči AChE u liriodeninu $3,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ a u huperzinu A jako standardu $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Inhibiční aktivita vůči BuChE testována nebyla¹¹³. Bohužel v této studii nebyly popsány podrobnější podmínky testu, především zdroj AChE, proto nelze získané výsledky přímo porovnávat.

Jelikož při AD v místě výskytu senilních plak dochází ke sterilnímu zánětu, který vyvolává mj. uvolňování kyslíkových radikálů, byl izolovaný alkaloid podroben testu na antioxidační aktivitu (DPPH test). Hodnota EC_{50} liriodeninu byla vyšší než $1000 \mu\text{M}$, tudíž je v tomto směru terapeuticky nevyužitelný.

V rámci řady fytochemických studií byl liriodenin testován na různé biologické aktivity. Do budoucna se nejvíce perspektivní jeví jeho účinky cytotoxické, antibakteriální, antifungální, trypanocidní a možná též anticholinesterázové^{74,108-113}.

7. LITERATURA

1. Novák M., v knize: *Patofyziológia* (Hulín I.), kap. 17.10, 6. vyd., SAP, Bratislava, 2002, 1397 s.
2. Růžička E., et al.: *Diferenciální diagnostika a léčba demencí*. 1. vyd., Galén, Praha, 2003, 175 s.
3. Geldmacher D. S., Whitehouse P. J.: Evaluation of dementia. *N. Engl. J. Med.*, 1996, 335(5), 330-336.
4. Atack J. R., Perry E. K., Bonham J. R., et al.: Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous systém. *J. Neurochem.*, 1986, 47, 263-277.
5. Rössner P.: Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurol. prax.*, 2004, 1, 11-16.
6. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařn.*, 2011, 7(1), 39-41.
7. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., et al.: Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr. Org. Chem.*, 2006, 10, 825-847.
8. Rektorová I.: Terapie demencí. *Neurol. prax.*, 2002, 4, 260-263.
9. Topinková E., v knize: *Klinická farmacie I* (Vlček J., Fialová D., et al.), kap. 7.3., 1. vyd., Grada, Praha, 2010, 368 s.
10. Fratiglioni L., Vitanen M., von Strauss E., et al.: Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: Incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology*, 1997, 48(1), 132-138.
11. Jirák R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. prax.*, 2008, 4, 224-227.
12. Bayles K. A., Kaszniak A. W.: *Communication and cognition in normal aging and dementia*. College Hill/Little Brown, Boston, 1987, 400 s.

13. Jiráček R.: Poruchy chování u pacientů s Alzheimerovou chorobou. *Neurol. prax.*, 2007, 8(5), 295-289.
14. Řípová D., Strunecká A.: An ideal biological marker of Alzheimer's disease: Dream or reality? *Physiol. Res.*, 2001, 50(2), 119-129.
15. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. 1. vyd. Grada Publishing, Praha, 1998, 229 s.
16. Lendon C. L., Ashall F., Goate A.: Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *JAMA*, 1997, 277(10), 825-831.
17. Jiráček R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Psych. prax.*, 2002, 2, 55-58.
18. Qizilbash N., et al.: *Evidence-based dementia practice*. Blackwell publishing company, Oxford, 2003, 894 s.
19. Zöllner B., Hock C., Kull H. U.: Rational therapy of Alzheimer dementia based on current clinical studies. *Praxis*, 2001, 90(19), 827-834.
20. Prince M., Cullen M., Mann A.: Risk factors for Alzheimer's disease and dementia: a case control study based on the MRC elderly hypertension trial. *Neurology*, 1994, 44(1), 97-104.
21. The Canadian Study of Health and Aging: Risk factors for Alzheimer's disease in Canada. *Neurology*, 1994, 44(11), 2073-2080.
22. Van Duijn C. M., Farrer L. A., Cupples L. A., et al.: Genetic transmission of Alzheimer's disease among families in a Dutch population based study. *J. Med. Genet.*, 1993, 30, 640-646.
23. Marx J.: New gene tied to common form of Alzheimer's. *Science*, 1998, 281(5376), 507-509.
24. Morrison-Bogorad M., Phelps C., Buckholtz N.: Alzheimer disease research comes of age: the pace accelerates. *JAMA*, 1997, 277, 837-840.
25. Small G. W., Rabins P. V., Barry P.P., et al.: Diagnóza a léčba Alzheimerovy nemoci a příbuzných poruch. Usnesení o konsenzu Amerického sdružení pro

- gerontopsychiatrii, Alzheimerovy asociace a Americké geriatrické společnosti. *JAMA-CS*, 1998, 6, 31-39.
26. Haass C., Selkoe D. J.: A technical KO of amyloid- β peptide. *Nature*, 1998, 391, 339-340.
 27. Takashima A., Murayama M., Murayama O., et al.: Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(16), 9637-9641.
 28. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékařem.*, 2009, 5(4), 176-178.
 29. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. Farm.*, 2004, 18, 212-214.
 30. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. prax.*, 2007, 2, 112-117.
 31. Wang R., Yan H., Tang X. C.: Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2006, 27, 1-26.
 32. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Voj. zdrav. listy*, 2003, 72(1), 37-44.
 33. Konrád J.: 32týdenní otevřené sledování účinnosti a bezpečnosti memantinu u nemocných s demencí u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie*, 2008, 12(3), 130-133.
 34. Danysz W., Parsons C. G., Mobius H., et al.: Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease – a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox. Res.*, 2000, 2, 85-97.
 35. Ishii K., Kitagaki H., Kono M., et al.: Decreased medial temporal oxygen metabolism in Alzheimer's disease shown by PET. *J. Nucl. Med.*, 1996, 37(7), 1159-1165.
 36. Robbins T. W., McAlonan G., Muir J. L., et al.: Cognitive enhancers in theory and practice: studies of cholinergic hypothesis of cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.*, 1997, 83(1-2), 15-23.

37. Evans D. A., Morris M. C.: Is a randomized trial of antioxidants in the primary prevention of Alzheimer disease warranted? *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 1996, *10(1)*, 45-49.
38. Sano M., et al.: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's disease cooperative study. *N. Engl. J. Med.*, 1997, *336(17)*, 1216-1222.
39. Birge S. J.: The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1997, *48(7)*, 36-41.
40. Jiráček R.: Farmakoterapie kognitivních funkcí u demencí se zaměřením na Alzheimerovu chorobu – současné možnosti a perspektivy. *Remedia*, 1997, *7(2)*, 92-96.
41. Whalley L. J., Struth M. A.: The prevention of cognitive decline in late life. *Alzheimer's Research*, 1999, *4*, 261-273.
42. López S., Bastida J., Viladomat F., et al.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.*, 2002, *71(21)*, 2521-2529.
43. Kalauni S. K., Choudhary M. I., Khalid A., et al.: New cholinesterase inhibiting steroidal alkaloids from the leaves of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *Chem. Pharm. Bull.*, 2002, *50*, 1423-1426.
44. Atta-ur-Rahman, Zaheer-ul-Haq, Khalid A., et al.: Pregnan-type steroidal alkaloids of *Sarcococca saligna*: a new class of cholinesterase inhibitors. *Helv. Chim. Acta*, 2002, *85*, 678-688.
45. Miyazawa M., Watanabe H., Kameoka H.: Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, *45*, 677-679.
46. Houghton P. J.: Activity and constituents of sage relevant to the potential treatment of symptoms of Alzheimer's disease. *Herbal Gram*, 2004, *61*, 38-53.

47. Chung Y. K., Heo H. J., Kim E. K., et al.: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells*, 2001, 11, 137-143.
48. Kang S. Y., Lee K. Y., Sung S. H., et al.: Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 2001, 64(5), 683-685.
49. Choudhary M. I., Azizuddin, Khalid A., et al.: A new coumarin from *Murraya paniculata*. *Planta Med.*, 2002, 68, 81-83.
50. Rollinger J. M., Stuppner H., Hornick A., et al.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 6248-6254.
51. Alcalá Mdel M., Vivas N. M., Hospital S., et al.: Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. *Neuropharmacology*, 2003, 44(6), 749-755.
52. Nordberg A., Lilja A., Lundqvist H., et al.: Tacrine restores cholinergic nicotinic receptors and glucose metabolism in Alzheimer patients as visualized by positron emission tomography. *Neurobiol. Aging*, 1992, 13(6), 747-758.
53. Pang Y. P., Quiram P., Jelacic T., et al.: Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271(39), 23646-23649.
54. Ishihara Y., Goto G., Miyamoto M.: Central selective acetylcholinesterase inhibitor with neurotrophic activity: structure-activity relationships of TAK-147 and related compounds. *Curr. Med. Chem.*, 2000, 7(3), 341-354.
55. Hirai K., Kato K., Nakayama T., et al.: Neurochemical effects of 3-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]-1-(2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-8-yl)-1-propanone fumarate (TAK-147), a novel acetylcholinesterase inhibitor, in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 280(3), 1261-1269.

56. Abe Y., Aoyagi A., Hara T., et al.: Pharmacological characterization of RS-1259, an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Sci.*, 2003, 93(1), 95-105.
57. Sterling J., Herzig Y., Goren T., et al.: Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.*, 2002, 45(24), 5260-5279.
58. Weinstock M., Gorodetsky E., Poltyrev T., et al.: A novel cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitor for the treatment of dementia comorbid with depression and Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2003, 27(4), 555-561.
59. Yogev-Falach M., Amit T., Bar-Am O., et al.: Involvement of MAP kinase in the regulation of amyloid precursor protein processing by novel cholinesterase inhibitor derived from rasagiline. *FASEB J.*, 2002, 16(12), 1674-1676.
60. ---: <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=3&id=72>, vystaveno dne 8.4.2012.
61. ---: http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/Rutaceae_Family.asp, vystaveno dne 8.4.2012.
62. ---: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ZAFa>, vystaveno dne 23.3.2012
63. ---: http://www.zsszyy.com/html/zyywh/201182/2548_2.html, vystaveno dne 23.3.2012
64. ---: http://www.rostliny.net/roslina/Zanthoxylum_nitidum, vystaveno dne 23.3.2012
65. ---: <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=9011>, vystaveno dne 23.3.2012
66. Kong D. Y., Alexander I. G., Tom G. H., Peter G. W.: *Biochem. Syst. Ecol.*, 1996, 24, 87-89.
67. National Pharmacopoeia Committee: *Chinese Pharmacopoeia*. 1. vyd., Chemical Industry Press, Peking, 2005, 116 s.

68. Kanjilal U. N.: *The Flora of Assam*. Vol. I, Omsons Publications, New Delhi, 1997.
69. Kirtikar K. R., Basu B. D.: *Indian Medicinal Plants*. Vol. I, 2. vyd., Bishen Singh Mahendra Pal Singh, New Delhi, 1933.
70. Hubík J., Dušek J., Spilková J., et al.: *Obecná farmakognosie II. Sekundární látky*. UK v Praze, SPN, Praha, 1989.
71. Hu J., Zhang W. D., Liu R. H., et al.: Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., and their analgesic and anti-inflammatory activities. *Chem. Biodivers.*, 2006, 3(9), 990-995.
72. Hu J., Zhang W. D., Shen Y. H., et al.: Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2007, 35, 114-117.
73. Cui X. G., Zhao Q. J., Chen Q. L., et al.: Two new benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*. *Helv. Chim. Acta*, 2008, 91, 155-158.
74. Yang C. H., Cheng M. J., Lee S. J., et al.: Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chem. Biodivers.*, 2009, 6, 846-857.
75. Chen J. J., Lin Y. H., Day S. H., et al.: New benzenoids and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum nitidum*. *Food Chem.*, 2011, 125, 282-287.
76. Geng D., Li D. X., Shi Y., et al.: A new benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum nitidum*. *Chin. J. Nat. Med.*, 2009, 7(4), 274-277.
77. Yang G., Chen D.: Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chem. Biodivers.*, 2008, 5(9), 1718-1722.
78. Yang C. H., Cheng M. J., et al.: Dihydrobenzo[c]phenanthridine alkaloids from stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. *J. Nat. Prod.*, 2008, 71, 669-673.
79. Yang Z., Zhang D., Ren J., et al.: Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Med. Chem. Res.*, 2011, 1-4.
80. Hu J., Zhang W. D., Shen Y. H., et al.: Two novel alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*. *Helv. Chim. Acta*, 2007, 90, 720-722.

81. Shen J. W., Zhang X. F., Peng S. L., et al.: *Nat. Prod. Res. Dev.*, 2005, 17, 33-34.
82. Hu J., Zhang W. D., Liu R. H., et al.: Chemical constituents in root of *Zanthoxylum nitidum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 2006, 31, 1689-1691. Chem. Abstr. 2007:1084500.
83. Huang Z. X., Li Z. H.: Studies on the antitumor constituents of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Huaxue Xuebao*, 1980, 38, 535-542. Chem. Abstr. 1981:99773.
84. Carpinella M. C., Andrione D. G., Ruiz G., et al.: Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytother. Res.*, 2010, 24, 259-263.
85. ---: <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/hbsag.html>, vystaveno dne 7.4.2012.
86. Yang H. I., Lu S. N., Liaw Y. F., et al.: Hepatitis B e-antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347(3), 168-174.
87. Schmidt E., Lötter M., McClelland W.: *Trees and shrubs of Mpumalanga and Kruger National Park*. Jacana, Johannesburg, 2002, 238 s.
88. Calaerwood J. M., Finkelstein N., Fish F.: Constituents of the stem and root barks of *Fagara capensis* (Thunb.). *Phytochemistry*, 1970, 9, 675.
89. Luo X., Pedro L., Milic V., et al.: Antibacterial benzofuran neolignans and benzophenanthridin alkaloids from the roots of *Zanthoxylum capense*. *Planta Med.*, 2012, 78, 148-153.
90. Chang C. E., Hartley T. G.: *Rutaceae in Flora of Taiwan*. 2. vyd., Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taipei, Taiwan, 1993, Vol. 3, 510-544.
91. Ko F. N., Hsiao G., Chen I. S., et al.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation and adhesion by a pseudocyanide derivative of avicine isolated from *Zanthoxylum integrifoliolum* (Merr.). *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 46, 1165-1173.
92. Chen J. J., Fang H. Y., Duh C. Y., et al.: New indolopyridoquinazoline, benzo[c]phenanthridines and cytotoxic constituents from *Zanthoxylum integrifoliolum*. *Planta Med.*, 2005, 71, 470-475.

93. Kaastra R. C.: A monograph of the pilocarpine (Rutaceae). *Flora Neotrop.*, 1982, 33, 1-198.
94. Goodman L. S., Gilman A.: *The pharmacological basis of therapeutics*. 10. vyd., McGraw Hill Companies Inc., New York, 2001.
95. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd., Grada, Praha, 2004, 725 s.
96. Pinheiro C. U. B.: Jaborandi (*Pilocarpus* spp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. *Econ. Bot.*, 1997, 51, 49-58.
97. Lucio E. M. R. A., Sharapin N., França H. S.: Estudo de alcaloides de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. *Rev. Brasil Farmacogn.*, 2002, 12, 130-131.
98. Moolla A., Viljoen A. M.: „Buchu“ – *Agathosma betulina* and *Agathosma crenulata* (Rutaceae): A review. *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 119, 413-419.
99. Watt J., Breyer-Brandwijk M.: *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*. 2. vyd., Livingstone, Edinburgh, 1962.
100. Simpson D.: Buchu – South Africa's amazing herbal remedy. *Scott. Med. J.*, 1998, 43, 189-191.
101. Van Wyk B. E., Van Oudtshoorn B., Gericke N.: *Medicinal plants of South Africa*. Briza Publications, Pretoria, South Africa, 1997, 304 s.
102. Schwegler M.: *Medicinal and other uses of southern Overberg fynbos plants*. Durban, South Africa, 2003, 48 s.
103. Campbell W. E., Finch K. P., Bean P. A., et al.: Alkaloids of the Rutoideae: tribe Diosmeae. *Phytochemistry*, 1987, 25, 433-434.
104. Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. 2. vyd., Springer Verlag, Berlin, 1969, 1041 s.
105. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 1974, 31, 172-180.
106. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88-95.

107. Zhang Z., ElSohly H. N., Jacob M. R., et al.: New sesquiterpenoids from the root of *Gutteria multivenia*. *J. Nat. Prod.*, 2002, 65, 856-859.
108. Liu Y. C., Chen Z. F., Peng Y., et al.: Research progress on liriodenine. *Linchan Huaxue Yu Gongye*, 2011, 31(4), 109-116. Chem. Abstr. 2011:1256875.
109. Costa E. V., Pinheiro M. L. B., Barison A., et al.: Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules*, 2011, 16, 9714-9720.
110. Da Cruz P. E. O., Costa E. V., De Souza Moraes V. R., et al.: Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 2011, 39, 872-875.
111. Costa E. V., Pinheiro M. L. B., Barison A., et al.: Alkaloids from the bark of *Gutteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. *J. Nat. Prod.*, 2010, 73, 1180-1183.
112. Costa E. V., Marques F. A., Pinheiro M. L. B., et al.: 7,7-dimethylaporphine alkaloids from the stem of *Gutteriopsis friesiana*. *J. Nat. Prod.*, 2009, 72, 1516-1519.
113. Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A. H. A., et al.: Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, 2012, 83, 298-302.

8. SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesteráza
CAT	cholinacetyltransferáza
CNS	centrální nervový systém
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EC	účinná koncentrace
ED	účinná dávka
Et ₂ O	diethylether
G+	grampozitivní bakterie
G-	gramnegativní bakterie
GIT	gastrointestinální trakt
GSK3 _β	glykogen syntáza kináza 3-β
HBV	virus hepatitidy B
HuAChE	humánní acetylcholinesteráza
HuBuChE	humánní butyrylcholinesteráza
IC	inhibiční koncentrace
IChE	inhibitor cholinesterázy
i. v.	intravenózní
MAO	monoaminoxidáza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát

NMR	nukleární magnetická rezonance
PPAR- γ	receptory aktivované proliferátory peroxizomů γ
PS1, PS2	presenilin 1, presenilin 2
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TLC	tenkovrstvá chromatografie

ABSTRAKT

Krejčová L.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 6. Alkaloidy *Zanthoxylum nitidum* a jejich biologická aktivita. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2012, 71 s.

Předmětem diplomové práce bylo připravit alkaloidní výtřeppek zpracováním 9,6 kg suché drogy *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae) a pomocí sloupcové a tenkovrstvé chromatografie izolovat alespoň jeden alkaloid v čisté formě. Ten byl následně podroben strukturní MS a NMR analýze a testován na biologickou aktivitu vůči lidským cholinesterázám (HuAChE, HuBuChE) a antioxidační aktivitu.

Izolovaná látka byla identifikována jako oxoaporfinový alkaloid liriodenin, jehož přítomnost v *Z. nitidum* byla popsána již dříve. Vůči HuAChE vykázal hodnoty inhibiční aktivity $IC_{50} = 51,07 \pm 3,23 \mu\text{M}$, vůči HuBuChE pak $IC_{50} = 101,10 \pm 5,31 \mu\text{M}$. Jako referenční látky byly použity galanthamin (IC_{50} (HuAChE) = $1,71 \pm 0,065 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzin A (IC_{50} (HuAChE) = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) > $1000 \mu\text{M}$) a eserin (IC_{50} (HuAChE) = $0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$).

V DPPH testu na antioxidační aktivitu vykázal liriodenin hodnotu EC_{50} vyšší než $1000 \mu\text{M}$, tudíž se jeho využití v tomto směru nelze očekávat.

Klíčová slova: *Zanthoxylum nitidum*, Rutoideae, izochinolinové alkaloidy, Alzheimerova choroba, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza.

ABSTRACT

Krejčová L.: Biologically active metabolites of plants 6. Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* and their biological activity. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2012, 71 p.

The aim of the diploma thesis was to prepare alkaloidal extract from *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae) by processing of 9,6 kg dried drug and isolate at least one pure alkaloid by column and thin layer chromatography. Subsequently this one was subjected to structural MS and NMR analysis and tested for biological activity against human cholinesterases (HuAChE, HuBuChE) and antioxidant activity.

Isolated substance was identified as an oxoaporphine alkaloid liriodenine, whose presence in *Z. nitidum* has already been described. Against HuAChE it exhibited values of inhibition activity $IC_{50} = 51,07 \pm 3,23 \mu\text{M}$, against HuBuChE $IC_{50} = 101,10 \pm 5,31 \mu\text{M}$. Galanthamine (IC_{50} (HuAChE) = $1,71 \pm 0,065 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzine A (IC_{50} (HuAChE) = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) > $1000 \mu\text{M}$) and eserine (IC_{50} (HuAChE) = $0,063 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} (HuBuChE) = $0,130 \pm 0,004 \mu\text{M}$) were used as positive controls.

In DPPH test for antioxidant activity liriodenine showed EC_{50} value higher than $1000 \mu\text{M}$, hence its use can not be expected in this direction.

Keywords: *Zanthoxylum nitidum*, Rutoideae, isoquinoline alkaloids, Alzheimer disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.