

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

RIGORÓZNÍ PRÁCE



Přírodní látky a jejich biologická aktivita VII.
Screening vybraných alkaloidních druhů rostlin na
cholinesterasovou aktivitu

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

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

Náchod 2016

Mgr. Jana Hovorková

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

RIGOROUS THESIS



Natural compounds and their biological activity VII.
Screening of selected alkaloidal plant species for
cholinesterase activity

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Supervisor: prof. RNDr. Lubomír Opletal CSc.

Náchod 2016

Mgr. Jana Hovorková

PROHLÁŠENÍ

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

V Náchodě, duben 2016

.....

podpis

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomohli s vypracováním rigorózní práce, v první řadě panu prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za jeho velikou vstřícnost, odborné vedení mé rigorózní práce, cenné připomínky, rady a poskytnuté materiály. Velké poděkování patří Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za hlavní podíl při stanovení antioxidační a inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE. Další díky patří celému kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie nejen za pomoc při řešení praktických i teoretických problémů, ale i za příjemnou atmosféru při práci a nakonec všem, kteří mi jakýmkoliv způsobem pomohli ke vzniku této práce. Děkuji celé své rodině za oporu.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 ALZHEIMEROVA DEMENCE	14
3.1.1 Alzheimerova demence – úvod	14
3.1.2 Neuropatologie u Alzheimerovy choroby	15
3.1.3 Léčba Alzheimerovy choroby	16
3.1.3.1 Inhibitory acetylcholinesterasy	16
3.1.3.2 Antiamyloidní terapie	18
3.1.3.3 Imunoterapie	18
3.1.3.4 Antagonisté NMDA receptorů	19
3.1.4 Jiné perspektivní směry	20
3.1.5 Adjuvantní terapie	20
3.2 PŘÍRODNÍ LÁTKY V TERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY	22
3.2.1 Inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy	22
3.2.1.1 Galanthamin	22
3.2.1.2 Sanguinin	23
3.2.1.3 1- <i>O</i> -acetyllykorin	23
3.2.1.4 Montanin, hippeastrin, pretazettin	23
3.2.1.5 Huperzin A	24
3.2.2 β -Karbolinové alkaloidy	25
3.2.2.1 Kassin a spektalin	26
3.2.2.2 Isaindigoton	26
3.2.3 Látky ovlivňující nikotinové receptory	26
3.2.4 Látky ovlivňující β -amyloid	27
3.3 POPIS ROSTLINNÝCH TAXONŮ	28
3.3.1 <i>Dictamnus albus</i> L.	28
3.3.2 <i>Dictamnus dasycarpus</i> L.	29
3.3.3 <i>Evodia rutaecarpa</i> L.	31
3.3.4 <i>Nelumbo nucifera</i> L.	32
3.3.5 <i>Phellodendron chinensis</i> L.	34
3.3.6 <i>Zanthoxylum bungeanum</i> L.	35
3.3.7 <i>Zanthoxylum nitidum</i> L.	37

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1 OBECNÉ METODY	40
4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel	40
4.1.2 Odpaření extraktů a jejich uchování	40
4.1.3 Rostlinný materiál	40
4.1.4 Příprava extraktů	41
4.1.5 Chemikálie, rozpouštědla a přístroje pro přípravu extraktů	42
4.2 STANOVENÍ CHOLINESTERASOVÉ AKTIVITY	43
4.2.1 Chemikálie, materiál, přístroje	43
4.2.2 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC_{50})	44
4.2.3 Metodika stanovení inhibiční aktivity	45
5 VÝSLEDKY	46
5.1 STANOVENÍ HODNOT IC_{50}	47
6 DISKUSE	49
7 LITERATURA	53
ABSTRAKT	59
ABSTRACT	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A β ₁₋₄₂	β -amyloid složený z daného počtu aminokyselin
ADINACO	Alzheimer's Disease and Natural COmpounds
AChE	acetylcholinesterasa
AK	aminokyselina
APP	amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenasa 2
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HEM	hematoencefalická bariéra
HepG2	liver hepatocellular carcinoma
iAChE	inhibitor acetylcholinesterasy
IL-1 β	interleukin 1 β
i.v.	intravenózní aplikace
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
TNF- α	tumor necrosis factor α

1 ÚVOD

Civilizační (chronické) nemoci jsou v dnešní době komplikovanou problematikou nejen v západních zemích světa, avšak také i v rozvojových zemích jejich počet postupně stoupá. Je to dáno stylem života, pro který je charakteristický vysoký příjem energie, minimum pohybové aktivity, stres, ale i znečištění životního prostředí. Průměrná délka života populace se pomocí modernějších postupů v medicíně prodlužuje. Díky špatnému životnímu stylu vzrůstá počet chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, osteoporóza, autoimunitní poruchy, neurodegenerativní nemoci a demence¹.

Demence je syndrom chronického a progresivního charakteru vznikající převážně následkem onemocnění mozku. Mezi hlavní příznaky demencí patří narušení kognitivních funkcí, aktivit denního života a chování, při kterých dochází k poškození paměti, orientace, řeči, myšlení a učení. Tyto příznaky jsou dost často spojovány také s poruchou kontroly, zvládání emocí nebo změnou motivace. V některých případech se mohou u pacientů objevit i psychotické znaky. Nejrozšířenějším typem demence je Alzheimerova choroba².

Alzheimerova nemoc vzniká pomalu a má progredientní průběh, který se vyznačuje charakteristickými příznaky. V časném stádiu postihuje typické rysy osobnosti, nemocní ztrácejí základní návyky, pravidla a zvyklosti. Dochází k poruše krátkodobé paměti a dalších kórových funkcí jako jsou apraxie, afázie, agnózie. Nemocní nezvládají základní péči o sebe².

V pokročilém stádiu se objevují poruchy jemné pohyblivosti a chůze, těžké poruchy paměti, chování, emocí a aktivit denního života. Na základě patofyziologie, dostupné terapie, péče o pacienta a jiných sociálních aspektů je průběh a délka choroby individuální. Nemoc trvá většinou po objevení prvních příznaků 7–10 let a končí smrtí³.

Počet pacientů trpících Alzheimerovou chorobou celosvětově narůstá. V současné době je to jeden z nejzávažnějších problémů sociální a zdravotnické politiky s nezanedbatelnou ekonomickou zátěží. V roce 2007 dosáhl počet pacientů s Alzheimerovou chorobou v zemích Evropské unie 6,1 milionů. V roce 2010 se tento počet zvýšil již na 7,3 milionů nemocných. Celkové náklady na léčbu byly odhadnuty na 130 miliard eur, přičemž více než polovina byla vynaložena na rodinnou péči⁴.

Vzhledem k rostoucímu počtu lidí trpících demencí a zejména také proto, že v současné době je k dispozici malá skupina léčivých přípravků s prokázaným klinickým efektem, se naznačují některé možnosti prevence demencí. Především se jedná o duševní a fyzickou aktivitu, sociální kontakty, složení stravy a faktory samotného životního stylu. Dále se jedná o intervenci farmakologickou, ve které se nejvíce zvažuje možnost hormonální substituční terapie u žen, antihyperlipidemik, antihypertenziv, preparátů z *Ginkgo biloba* nebo použití nesteroidních antirevmatik⁴. Z několika studií zabývajících se účinkem antihypertenziv potvrdily preventivní efekt pouze dvě, PROGRESS a Syst-Eur, které dokazují snížení rizika kognitivního deficitu o 55 %. Takový mechanismus nabízí například blokátor kalciového kanálu, který prostupuje mozkomíšní bariérou a může pravděpodobně působit protektivně. Existují i důkazy pro účinnost antioxidantů, n-3 mastných kyselin nebo flavonoidů obsažených zejména v čaji a kávě⁴.

V současném výzkumu nových léčiv na Alzheimerovu nemoc dochází k rozporuplným výsledkům. U mnoha skupin léčiv existovaly kladné výsledky druhé fáze klinických zkoušek, ale třetí fáze přinesla výsledky negativní. Mohlo dojít buď k chybám v oblasti výběru kandidátních léčivých přípravků, dávkování, době podávání, ve strategii léčby včetně podrobného definování neuropatologie anebo stadia onemocnění. Zvažuje se proto ustanovení nových pravidel pro preklinické a klinické studie⁴.

Současné zaměření na problematiku τ -proteinu a β -amyloidu je pomalu překonáno a bude nutné zkoumat komplexnější mechanismy, zejména funkci buněčných organel, neuronální regeneraci a metabolické faktory v souvislosti s metabolickým syndromem. Jedním z klíčů k etiopatogenezi mohou být i synaptické funkce, které přímo souvisí s funkcí mitochondrií⁴.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mojí rigorózní práce byl screening vybraných morfologických částí vyšších rostlin z hlediska inhibiční aktivity vůči lidské acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE), zahrnující:

- 1) Literární rešerši na taxony s obsahem především isochinolinových alkaloidů, které nebyly dosud sledovány z hlediska vlivu na uvedené enzymy,
- 2) Výběr rostlinných taxonů a zajištění vzorků morfologických částí,
- 3) Příprava alkaloidních koncentrátů pro biologické testy *in vitro*,
- 4) Zjištění inhibiční aktivity na lidskou erytrocytární AChE a lidskou sérovou BuChE,
- 5) Vyhodnocení výsledků,
- 6) Návrh taxonu pro další studium.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova demence

3.1.1 Alzheimerova demence – úvod

Pojem Alzheimerova nemoc původně pochází z roku 1910 od Emila Kraepelina, který ji nazval dle Aloise Alzheimer, autora jejího prvního popisu. Alois Alzheimer vydal v roce 1907 původní práci o chorobě svého pacienta, v níž popsal četné amyloidové plaky a neurofibrilární spleti v mozkové tkáni⁵.

Nemoc se rozvíjí zcela nenápadně. Zpočátku se většinou diagnostikuje jako mírná porucha kognitivních funkcí. Poměrně brzy se rozvíjí také poruchy orientace v čase a prostoru. Pacienti začnou bloudit ve známých, ale sporadicky navštěvovaných místech. S rozvojem demence se ztrácejí v okolí svého bydliště a v nejtěžších stádiích i ve vlastním bytě. V důsledku ztráty časové orientace jdou nakupovat například v noci. Jsou kompletně dezorientovaní. V průběhu choroby dochází k zapomínání pojmů, jmen a ke snižování slovní zásoby³.

U menšího počtu pacientů je postiženo Alzheimerovou chorobou více pokrevních příbuzných v rodině. Z tohoto důvodu byly hledány genetické faktory pro vznik samotného onemocnění. Několik genových mutací bylo nalezeno na chromozomech 21, 14 a 1. Změny v genetickém zápisu vedou ke spuštění tvorby a ukládání β -amyloidu, bílkoviny způsobující chorobu. Mezi rizikové faktory patří i genetické polymorfismy. Geneticky zakódovaná bílkovina se může vyskytovat v několika formách. Formy mohou být odlišné některou z aminokyselin, ale u všech forem zůstává zachována základní funkce. Takovou látkou je například bílkovina přenášející cholesterol apolipoprotein E. Forma $\epsilon 4$ se u alzheimerovských pacientů vyskytuje podstatně častěji než u ostatní populace, avšak není nezbytnou příčinou ke vzniku choroby. K rozvoji onemocnění je nutné genetické podmínění na více místech, ale velmi důležitou roli hrají i faktory negenetické³.

Riziko zvýšení výskytu demence může ovlivnit i nedostatek kyseliny listové a vitamínu B₁₂ pravděpodobně tím, že dojde ke snížení produkce neurotransmiterů noradrenalinu, serotoninu a dopaminu. Poškození funkce mozku může způsobit i zvýšená hladina cholesterolu, neboť mozkové cévy mohou být postiženy stejně tak, jako cévy v jiných částech těla. Větší výskyt choroby ovlivňují i nízké sérové hladiny vitamínů C, E, β -karotenu a dalších důležitých antioxidantů. Účinnými metodami pro snížení rizika onemocnění je udržení normálních hodnot glykemie a krevního tlaku,

optimální hladina cholesterolu, vyvážená strava, omezená reakce na stres, dostatek intelektuální a fyzické aktivity⁶.

3.1.2 Neuropatologie u Alzheimerovy choroby

Některé patologické nálezy v mozku jsou společné pro všechny nemocné, ale existuje určitá interindividuální variabilita mezi dobou vzniku, rychlostí progresu, genetické predispozice a dalších faktorů ovlivňujících vznik a průběh choroby. U většiny mozkových nálezů lze prokázat obraz kortiko-subkortikální atrofie. Atrofie se vyskytuje v mediálních temporálních strukturách (amygdala, hipokampus a parahipokampální kůra) a doprovází ji rozšíření temporálních rohů v postranních mozkových komorách⁷.

Při Alzheimerově degeneraci se vyskytují v extracelulárních prostorech mozkového kortexu chomáče nervových vláken, v jejichž středu se objevuje hrudka tvořená patologickým proteinem β -amyloidem. Na základě tohoto nálezu vznikla hypotéza, že β -amyloid poškozuje výběžky nervových buněk. Další charakteristické patologické změny jsou například tvorba samotného β -amyloidu a formace plaků, amyloidová angiopatie, selektivní zánik acetylcholinergních neuronů, degenerace τ -proteinu, působení volných kyslíkových radikálů či vysoký obsah monoaminoxidasy typu B⁷.

Odloučením kratšího úseku z „mateřské“ molekuly amyloidového prekurzorového proteinu pomocí β - a γ -sekretasy vzniká patologický β -amyloid. Podobné koncentrace celkového β -amyloidu byly nalezeny i u zdravých jedinců. Proto se detailnějším výzkumem prokázalo, že odlišit zdravé jedince od nemocných můžeme pomocí různých isoform β -amyloidu podle délky aminokyselinové sekvence. Opakovaně byla zjištěna u pacientů v mozkomíšním moku snížená koncentrace β -amyloidu o 42 AK ($A\beta_{42}$) zhruba na polovinu. Ukládáním amyloidu ve stěnách mozkových cév vzniká amyloidní angiopatie^{7,8}.

τ -Protein se řadí mezi fosfoproteiny spojující mikrotubuly v axonech. Jeho fyziologickou funkcí je podpora polymerizace a důležitou úlohu hraje i při axonálním transportu. Částečně se také podílí na uspořádání a stabilitě mikrotubulů. V patologický protein se přemění τ -protein při nadměrné fosforylaci neuronových mikrotubulů a v této hyperfosforylované formě vede k jejich polymerizaci. Degenerace je spuštěna některými proteinkinasami, přičemž mezi nejdůležitější patří glykogen syntasa kinasa-3 β , která může být aktivována β -amyloidem. Degenerovaný τ -protein poté utváří heliakální filamenta, která jsou základem neurofibrilárních uzlíčků, tzv. tangles. Napadené neurony poté zanikají^{7,8}.

Při vzniku sterilního zánětu v oblasti plaků dochází v akutní reakční fázi k aktivaci COX-2, uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů, které peroxidují neuronové lipidové membrány. Těmito procesy jsou způsobeny další neurodegenerativní změny. Při degeneraci neuronů jsou uvolňovány excitační aminokyseliny (aspartát, glutamát), které jsou vázány v CNS na své receptory. Nadměrná excitace NMDA receptorů, která je spojena s otevřením kalciového kanálu, vede k influxu vápníku do neuronů. Porušením stability vnitřního prostředí neuronů dochází k aktivaci proteinkinasy a následně nastává jejich smrt. Dochází ke kaskádové reakci a k opětovnému uvolnění excitačních aminokyselin. U pacientů postižených Alzheimerovou chorobou je v kortexu porušeno zpětné vychytávání glutamátu, čímž je zvýšena excitotoxicita. Nadměrnou aktivací NMDA receptorů dochází k tvorbě přenosových šumů a k nedostatečnému přenosu podnětu působícího na receptor⁷.

Při Alzheimerově degeneraci je sníženo uvolňování acetylcholinu z presynaptického zakončení acetylcholinergních receptorů. Je snížena i aktivita enzymu cholinacetyltransferasy, která syntetizuje acetylcholin z acetyl-koenzymu A a cholinu. Post- i presynaptické nikotinové a muskarinové acetylcholinergní receptory jsou zachovány relativně dobře. Po uvolnění acetylcholinu z vazby na receptorech je acetylcholin odbouráván enzymy acetylcholinesterasami a v případě Alzheimerovy choroby i butyrylcholinesterasami⁹.

Acetylcholinesterasy mají více forem. Tetramerní forma G4 převládá v mozku zdravého jedince, naopak její množství klesá u nemocného. Monomerní forma G1 je u zdravého jedince obsažena pouze minoritně, u nemocného ale její obsah stoupá. Butyrylcholinesterasa se za normálních podmínek vyskytuje pouze v minimálním množství, avšak u alzheimerovských pacientů je tvořena aktivovanými gliovými elementy v oblasti plaků. Tento enzym se podílí na odbourávání acetylcholinu. Díky tomuto jevu počet molekul acetylcholinesterasy klesá, ale zvyšuje se počet molekul butyrylcholinesterasy⁹.

3.1.3 Léčba Alzheimerovy choroby

3.1.3.1 *Inhibitory acetylcholinesterasy*

Hypotéza cholinergní neurotransmise je základem léčby určené k udržení a zvýšení aktivity zbývajícího cholinergního systému. Inhibice synaptické cholinesterasy je výhodnější z důvodu většího přirozeného uvolňování acetylcholinu, čímž pomáhá

k oddálení progresu nemoci, zlepšuje denní aktivity a je také lépe snášena oproti celkové stimulaci muskarinových a nikotinových receptorů¹⁰.

Inhibitory acetylcholinesterasy by měly být dle doporučení britského veřejného zdravotního úřadu National Institute for Clinical Excellence (NICE) určeny pro terapii lehké až středně těžké demence¹¹.

V praxi se ale běžně setkáváme s tím, že existují patrné rozdíly v rychlosti progresu a efektivita jednotlivých typů iAChE není u všech pacientů stejná. Rozdíl je dán různou selektivitou iAChE vůči AChE. Účinnost iAChE byla prokázána i u pacientů trpících vaskulární demencí, Parkinsonovou chorobou nebo demencí s Lewyho tělísky¹⁰.

Některé inhibitory inhibují pouze acetylcholinesterasy, jiné také významně kromě acetylcholinesteras i butyrylcholinesterasy. Od inhibitorů se očekává dobrý přístup HEM a specifická inhibice mozkové, nikoliv periferní formy acetylcholinesteras. Dalším předpokladem iAChE je jejich schopnost snížit tvorbu β -amyloidu ovlivněním enzymů γ -sekretas. Tato chemicky nejednotná skupina se liší v typu inhibice a v reakci na molekuly butyrylcholinesterasy⁹.

V současné době jsou k dispozici tři inhibitory acetylcholinesterasy. Do této skupiny patří galanthamin, rivastigmin a donepezil. Nejpoužívanějším centrálním inhibitorem na světě je donepezil. Chemicky se jedná o piperidinový derivát. Preferenčně ovlivňuje acetylcholinesterasu mechanismem reverzibilní inhibice. Vzhledem k vysoké vazbě na plazmatické proteiny se může v plazmě akumulovat. Metabolismus probíhá přes jaterní enzymatický systém P450, nepůsobí hepatotoxicky a je vcelku dobře tolerován^{9,10}.

Pseudoireverzibilní inhibitor rivastigmin se řadí mezi karbamátové deriváty a kromě mozkových AChE inhibuje i BuChE. Jeho účinnost byla prokázána řadou studií a samotnou klinickou praxí. Jeho vazba na plazmatické proteiny je nízká, což snižuje možnost kumulace a tím i potenciál k lékovým interakcím^{9,10}.

Galanthamin má duální působení. Reverzibilně inhibuje acetylcholinesterasu a allostericky moduluje nikotinové receptory. Tím zlepšuje výdej acetylcholinu z presynaptického zakončení a také zabraňuje ztrátě citlivosti postsynaptických muskarinových receptorů.

Ve fázi klinických zkoušek se nachází také preparát s názvem TAK-157. Tato látka má dvojitý mechanismus účinku. Nejenže inhibuje acetylcholinesterasu, ale také jeho působením dochází k uvolňování nervových růstových faktorů. Další perspektivní látkou je eptastigmin, který je v současné době také ve fázi klinických testů⁹.

3.1.3.2 *Anti-amyloidní terapie*

Tato skupina léčiv, která jsou většinou ve fázi klinických studií, brání tvorbě β -amyloidu. Zejména se jedná o látky působící na sekretasy, enzymy štěpící amyloid prekursorový protein. Pokud je tento glykoprotein štěpen γ - a β -sekretasou, vzniká fragment, β -amyloid, který má tendenci k agregaci a vytváření amyloidových plaků. Při štěpení glykoproteinu α -sekretasou se tvoří solubilní fragmenty, které neagregují. V poslední době se zdůrazňuje i význam oligomerů β -amyloidu. Oligomery lépe procházejí extracelulárním prostorem mozku a ovlivňují negativně synaptické funkce. Jedním z významných intramembranózních komplexů je γ -sekretasa, která štěpí kromě β -amyloidu i jiné proteiny¹².

Do klinických studií vstoupilo několik preparátů s účinkem na tento enzym. V roce 2008 byly zahájeny dvě významné randomizované studie, ve 3.fázi klinického výzkumu se nachází látka semagacestat, která snižuje produkci β -amyloidu v mozku a koncentraci β -amyloidu v plazmě. Výsledky jsou stále v očekávání, ale látka se prozatím jeví nadějně. Begacestat je další nadějnou látkou ovlivňující γ -sekretasu s omezením vedlejších účinků¹².

Mezi léčiva, modulátory γ -sekretas, lze také zařadit některá nesteroidní antirevmatika (indometacin, ibuprofen, aj.). Testován byl i *R*-enantiomer Tarenflurbil, avšak pro nízký průnik mozkomíšní bariérou měl velmi malou schopnost modifikovat γ -sekretasu. Další cestou k vývoji nového léčiva je výzkum aktivátorů α -sekretas. Enzym štěpí APP na solubilní fragmenty a tak může působit neuroprotektivně. Několik skupin léčiv je schopno stimulovat tento enzym, ale u žádné se neprokázal klinický efekt. Další vývoj léčiv se zaměřuje na ovlivnění agregace β -amyloidu. Ani v této skupině neprokázaly zkoumané preparáty významné klinické efekty¹².

3.1.3.3 *Imunoterapie*

V současné době je ve fázi klinických výzkumů několik látek bez neurotoxického potenciálu fungujících na principu pasivní i aktivní imunizace. Ve fázi klinických zkoušek jsou látky gantenerumab a solanezumab fungující na principu pasivní imunoterapie, která je založena na zachování umělých hladin protilátek působících na β -amyloid (IgG). Látky vykazují vyšší efektivitu u časných stadií nemoci. Podávají se ve formě infuzí a zabraňují akumulaci β -amyloidu¹³.

Mezi pasivní imunizaci je řazena i aplikace komplexní směsi imunoglobulinů (i. v.), jejíž součástí jsou protilátky proti β -amyloidu a směs přirozených lidských

imunoglobulinů. Preparát vykazoval v počátečních pilotních studiích vysokou efektivitu proti vzniku β -amyloidu, pomáhal jeho vylučování z mozku a chránil neurony před toxicitou zprostředkovanou β -amyloidem. Protilátky nejsou schopné rozpoznat chemické složení β -amyloidu, ale identifikují jeho tvar a špatné složení, aniž by poškodily zdravé molekuly. Látka se nachází již v závěrečné fázi klinických zkoušek¹³.

3.1.3.4 Antagonisté NMDA receptorů

Glutamát je jednou z excitačních aminokyselin umožňující přenos signálu na 40-60 % synapsích v CNS. Váže se na ionotropní receptory, které poskytují rychlý přenos kationtů (K^+ , Ca^{2+} , Na^+). Tyto receptory se dále dělí na NMDA (*N*-methyl-D-aspartát) a AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazopropionová kyselina).

Za fyziologického stavu je iontový kanál NMDA blokován Mg^{2+} . K depolarizaci membrány dochází po uvolnění glutamátu a Mg^{2+} opouští kanál. Dochází k influxu Na^+ a Ca^{2+} a k effluxu K^+ . Receptor zůstává po aktivaci otevřený delší dobu a dochází ke vstupu Ca^{2+} . Současnou aktivací AMPA dochází k parciální depolarizaci membrány, která teprve odblokuje Mg^{2+} z iontového kanálu a tím umožní vstup Ca^{2+} do neuronů¹⁴.

Jedinou dnes používanou látkou patřící do této skupiny je memantin. Původně byl vyvíjen jako perorální antidiabetikum, avšak hypoglykemizující účinek nikdy prokázán nebyl. Memantin ovlivňuje i středně těžké a těžké formy demence, které se doposud zdály farmakologicky neovlivnitelné. Jako nekompetitivní antagonist a nahradí Mg^{2+} v iontovém kanálu a tím blokuje vstup Ca^{2+} iontů do buněk. Tímto způsobem chrání neurony před toxickým glutamátem. Memantin je vysoce napětově závislý, takže po příslušném impulsu opouští z presynapse iontový kanál a tím dává prostor fyziologické funkci glutamátu v oblasti paměti a učení. Z toho vyplývá, že blokuje funkci pouze patologickou, ale fyziologickou aktivitu NMDA receptorů podporuje. Memantin nevykazuje účinek pouze na NMDA receptory, ale také blokuje serotoninové 5-HT₃ receptory, které potlačují narušenou gastro-intestinální motilitu a nauzeu. Proto se často přidává k donepezilu ke zmírnění nepříjemných nežádoucích účinků. Ve vyšších koncentracích je schopný antagonizovat i některé receptory nikotinové. Memantin je pacienty dobře snášen a představuje účinnou necholinergní alternativu léčby¹⁴.

3.1.4 Jiné perspektivní směry

Neurofin neboli neuronální růstový faktor umožňuje přežití i obnovu neuronů. Infuzní léčba prokázala určitý efekt u Alzheimerových pacientů, avšak problematická je samotná aplikace dostatečné dávky a transport přes mozkomíšni bariéru. V současné době se zvažuje jiná forma aplikace, ať už možnost intranasální aplikace roztoku nebo možnost genové terapie s cílem zvýšit hladinu neuronálního růstového faktoru v mozku¹².

Samotný β -amyloid může být ovlivněn i nepřímo metodou plazmaferesy. Předpokladem této metody je existence rovnováhy mezi obsahem amyloidu v periferní krvi a likvoru. Snížením hladiny v periferní krvi dojde i k jejímu snížení v likvoru. Tento směr léčby se jeví nadějně, ovšem klinickému využití bude bránit složitost samotné procedury.

Další perspektivní sloučeninou je látka zabraňující agregaci β -amyloidu označená BPT2. Inhibice probíhá za pomoci mědi a zinku. Ukončené klinické studie dokázaly, že redukuje hladiny $A\beta_{42}$. Zcela odlišný směr výzkumu se zabývá problematikou efektivity léčby v závislosti na fenotypu (závažnost, dynamika, věk, propuknutí onemocnění) a genotypu apolipoproteinu E. Tento přístup zlepšuje možnost využití doposud používaných farmak¹³.

3.1.5 Adjuvantní terapie

Tato skupina léčivých přípravků není podložena přímými důkazy o jejich účinnosti, neboť jejich průkaznost je velmi nízká. Používají se většinou jako přídatná terapie k terapii klasické. Patří sem látky různorodého původu, mimo jiné rostlinného i živočišného⁹.

Při Alzheimerově degeneraci je uvolňováno větší množství volných kyslíkových radikálů, které poškodí některé enzymy. Vlivem tohoto jevu dochází k lipoperoxidaci neuronální membrány, a tak jsou urychleny apoptické děje. K zachycení volných kyslíkových radikálů se používají tzv. scavengery, nebo-li zametače. Antioxidačním mechanismem a samotným zlepšením neuronálního metabolismu působí extrakt *Ginkgo biloba* (Egb 761). Jedná se o směs účinných látek, které fungují různými mechanismy účinku. Používá se jako přídatné léčivo k memantinu a inhibitorům mozkových cholinesteras^{9,15}.

Mezi další antioxidační látky se řadí vitamín E, který v dávkách 200 IU denně podávaný po delší dobu vykazuje určitý preventivní efekt na rozvoj Alzheimerovy

demence. Mezi antioxidanty s preventivním efektem dále patří kyselina lipoová, β -karoten, melatonin, resveratrol. Selen je taktéž látka likvidující volné kyslíkové radikály. Odlišným mechanismem působí nicergolin, který zesiluje mozkovou mikrocirkulaci a tím je schopen zvýšit acetylcholinergní přenos^{9,15}.

Neracionální je podávání nootropních farmak. Pyritinol ani piracetam neprokázaly při léčbě dostatečnou účinnost. Selegilin působí jako růstový faktor v tkáňových kulturách, avšak efekt *in vivo* prozatím dokázán nebyl. K syntéze růstových hormonů se používá hydrolyzát vepřových mozků Cerebrolysin obsahující aminokyseliny a velmi krátké peptidy. Podává se v infuzi, ale v klinických studiích efekt prokázán nebyl. Preventivní účinek je sporný i u estrogenní substituce u postklimakterických žen, ačkoliv estrogeny stimulací estrogenních receptorů v mozku mají příznivé trofické efekty na mozkovou tkáň a uvolňují růstové faktory. Více nadějných látek se dále ověřuje v preklinických a klinických výzkumech^{9,15}.

3.2 Přírodní látky v terapii Alzheimerovy choroby

3.2.1 Inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

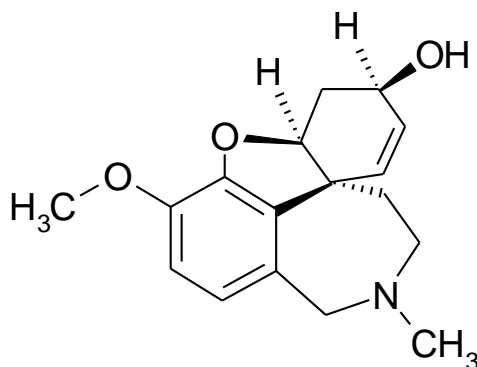
3.2.1.1 Galanthamin

Galanthamin se po chemické stránce řadí mezi terciární alkaloidy. Poprvé byl izolován počátkem padesátých let z cibulek divokých sněženek (*Galanthus woronowi*) bulharskými farmakology (Proskurnina, Jakovleva). Ihned po objevu byl využíván ve východní Evropě jako antidotum kurare pod názvem Nivalin. Inhibiční vliv na acetylcholinesterasu byl popsán počátkem šedesátých let a v roce 1964 prostup hematoencefalickou bariérou do CNS. Jeho schopnost allosterické modulace nikotinových receptorů byla objevena v první polovině devadesátých let. První pozitivní výsledky studie s galanthaminem u nemocných s Alzheimerovou chorobou byly publikovány v roce 1989 a 1994, po provedení dalších kontrolních studií byl registrován v roce 2000–2002 v řadě zemí světa¹⁶.

Galanthamin je reverzibilní a kompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy. Po jeho podání se zvyšuje koncentrace acetylcholinu v synpasích CNS. Je natolik specifickým inhibitorem, že má minimální schopnost ovlivnit butyrylcholinesterasu. Cholinergní přenos je zlepšen také allosterickou modulací nikotinových receptorů, hlavně podtypů $\alpha 4$, $\beta 2$ a $\alpha 7$. K zesílení cholinergní transmise dochází ovlivněním postsynaptických nikotinových receptorů, naopak modulace presynaptických receptorů zvyšuje syntézu a uvolňování nejen acetylcholinu, ale i serotoninu, dopaminu, glutamátu a GABA. Neopomenutelným účinkem galanthaminu je také jeho neuroprotektivní efekt. Reguluje přímo antiapoptický element bcl-2, brání zániku nikotinových receptorů vlivem β -amyloidu díky aktivaci receptoru podtypu $\alpha 7$, chrání buňky před toxickým β -amyloidem v buněčných kulturách a brání štěpení APP za zvýšené tvorby solubilního APP. Galanthamin je tedy kongnitivum s duálním působením¹⁶.

Ze struktury galanthaminu bylo připraveno mnoho derivátů. Deriváty se získávaly obměnou funkčních skupin, terciární aminoskupiny a methoxyskupiny. V testech vykazovaly vyšší inhibici acetylcholinesterasy než původní galanthamin, avšak jejich vyšší polarita jim rovněž brání proniknout do CNS. Jako nadějný se ukazuje ester galanthaminu *N*-butylkarbamát, který má nižší polaritu, je méně toxický a *in vitro* dosáhl inhibice 85% inhibiční aktivity galanthaminu. Další deriváty vycházejí z *bis*-

galanthaminových (homodimery) a galanthamin-galanthaminiových (heterodimery) solí. Vyšší acetylcholinesterasovou aktivitu vykazovaly sloučeniny heterodimerové série. Zdá se, že klíčovou strukturou pro inhibiční elekt sloučeniny je iminová skupina¹⁷.



Obr. 1 Galanthamin

3.2.1.2 Sanguinin

Sanguinin je po chemické stránce derivátem galanthaminu (9-*O*-demethylgalanthamin). V pokusech *in vitro* vykazuje mnohem vyšší účinnost než samotný galanthamin. Vyskytuje se v cibulích rostlin *Galanthus nivalis* (sněženka podsněžník) a *Eucharis grandiflora* (líbenka velkokvětá) z čeledi Amaryllidaceae. Jeho izolace proběhla mnohem později, protože jeho výskyt v cibulích je pouze ve stopovém množství¹⁸.

3.2.1.3 1-*O*-acetyllykorin

Tato látka je derivátem alkaloidu lykorinu, vyskytujícího se v africké rostlině *Ammocharis coranica* z čeledi Amaryllidaceae, která se pěstuje i pro okrasné účely. Z čeledi Amaryllidaceae bylo izolováno celkem dvacet tři alkaloidů vykazujících inhibiční aktivitu. Inhibiční efekt AChE vůči 1-*O*-acetyllykorinu je srovnatelný s galanthaminem^{18,19}.

3.2.1.4 Montanin, hippeastrin, pretazettin

Všechny tři látky se řadí mezi isochinolinové alkaloidy. Ověření inhibiční aktivity na acetylcholinesterasu probíhalo podle Ellmanovy metody. Sloučeniny byly testovány v koncentracích 1 mM, 500 μM, 100 μM. Nejvyšší účinek prokazoval montanin, jehož inhibice dosahovala v koncentraci 1mM přes 50 %, ve 500 μm a 100 μm 30 – 45 %. Výsledky hippeastrinu a pretazettinu nebyly při studiích nikterak významné²⁰.

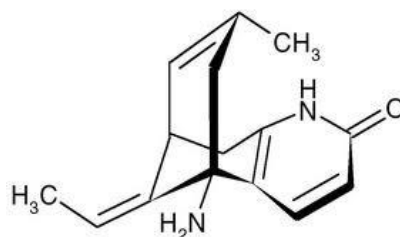
3.2.1.5 Huperzin A

Huperzin je alkaloid vyskytující se v rostlině *Huperzia serrata* (vranec pilovitý) z čeledi Huperziaceae, ale i v některých plavuních z čeledi Lycopodiaceae a v malých množstvích i v rostlinách rodu *Selaginella*. Vranec pilovitý se používá již stovky let v tradiční čínské medicíně pod názvem selagin. Využití našel především v léčbě pohmožděnin, krevních ztrát, otoků a schizofrenií²¹.

Huperzin má mnoho strukturních typů (huperzin A, B, C – W). V rostlinách je nejčastěji obsažen huperzin A, který má majoritní postavení a dále huperzin B. Huperzin B prokazuje širší terapeutický index, avšak má nižší afinitu k AChE. Huperzin A se vyskytuje ve dvou optických izomerech, (+)-huperzin A a (-)-huperzin A. Enantiomer (-)-huperzin A je až 7× terapeuticky aktivnější a prokazuje i vyšší afinitu k AChE. Testován byl i racemát, jehož organická syntéza je ekonomicky výhodnější. Huperzin A je reverzibilní inhibitor vykazující vysokou specifitu k AChE. Selektivně inhibuje formu G4 AChE, přičemž ostatní dosud používaná léčiva inhibují i G1 formu. Huperzin A způsobuje zvýšení hladiny acetylcholinu až 8× více než ostatní inhibitory a tento efekt je i déletrvající²¹.

Popsány byly i určité antioxidační vlastnosti huperzinu A. Experimentálně došlo ke zmírnění apoptických procesů vyvolaných neurotoxickým β -amyloidem. Popsána byla i schopnost působit jako antagonist *N*-methyl-D-aspartátového receptoru. Huperzinu A jsou připisovány i jiné pozitivní účinky na organismus. Jeho schopností je regenerovat a podporovat růst mozkových buněk po hypoxii nebo po ischemii²¹.

Prozatím proběhla dvojité zaslepená studie v Číně, kde byl huperzin A prohlášen za účinnou a bezpečnou látku. Látka byla podávána jednou až dvakrát denně v dávce $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Prokázaný cholinergní efekt po podání přetrvával minimálně 6 hodin. Na čínském trhu je již huperzin A a dalších 38 podpůrných látek obsažených v preparátu registrován pod názvem Focus Fast. V Evropě probíhá klinická studie s proléčivem ZT-1, což je Schiffova báze huperzinu A. Podle preklinických výsledků lze soudit, že tato látka má vyšší biologickou dostupnost v jednotlivých mechanismech než samotný huperzin A. V současné době probíhají klinické zkoušky na pacientech s lehkou a středně těžkou demencí a výsledky se prozatím jeví velmi nadějně^{21,22}.

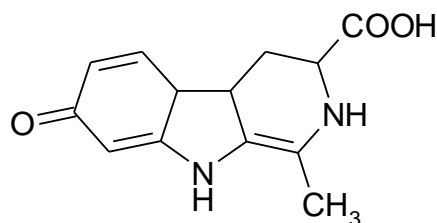


Obr. 2 Huperzin

3.2.2 β -Karbolinové alkaloidy

Drogy obsahující β -karbolinové alkaloidy se v tradiční indické medicíně používají k léčbě střevní malnutrice a očních onemocnění. Dalšími prokázanými účinky jsou efekty na soustavu kardiovaskulární, muskulární a centrální nervovou soustavu. Velký rozsah jejich biologické aktivity je dán schopností inhibovat monoaminoxidasy a AChE, vázat se na serotoninové, benzodiazepinové, dopaminové a imidazolinové receptory. Vykazují i mutagenní efekt, který je dán schopností interkalace DNA a inhibice enzymů zapojených do syntézy DNA¹⁸.

Zajímavé β -karbolinové alkaloidy byly nalezeny i v některých druzích hub. Plodnice pavučince tmavohnědého (*Cortinarius brunneus*) obsahovala čtyři β -karbolinové alkaloidy – brunneiny A – C a 3-(7-hydroxy-9H-beta-karbolin-1-yl)propanovou kyselinu. Nejvyšší aktivitu vůči AChE vykazoval brunnein A. Z dalších hub čeledi Cortinariaceae, konkrétně z pavučince olivového (*Cortinarius infractus*), byly izolovány dva alkaloidy, infraktopikrin a 10-hydroxy-infraktopikrin. Obě látky prokázaly inhibiční aktivitu na AChE a mnohem vyšší selektivitu než galanthamin. Nízká cytotoxicita sloučenin je dobrým předpokladem pro další výzkum možných perspektivních léčiv²².



Obr. 3 Brunnein A

3.2.2.1 *Kassin a spektalin*

Oba hydroxypiperidinové alkaloidy byly izolovány z rostliny *Senna spectabilis* z čeledi Fabaceae, které prokázaly celkem dobrou účinnost na AChE. Z obou alkaloidů byly připraveny polosyntetické deriváty s vystupňovaným inhibičním potenciálem, (-)-3-*O*-acetyl-kassin hydrochlorid a (-)-3-*O*-acetyl-spektalin hydrochlorid. Těchto poznatků se využívá k dalšímu výzkumu vztahu mezi potenciálním terapeutickým efektem a velikostí postranního řetězce²⁴.

3.2.2.2 *Isaindigoton*

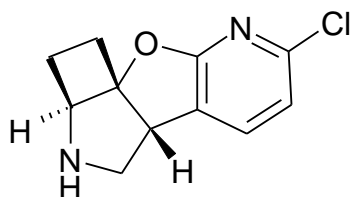
Isaindigotin je alkaloid izolovaný z kořenů čínské rostliny *Isatis indigotica* z čeledi Brassicaceae. Tato látka strukturálně podobná takrinu má selektivní účinek na BuChE. Díky těmto vlastnostem se stala předlohou pro syntézu nových derivátů, jejichž selektivita vůči cholinesterasám je pomocí jednoduché substituce ovlivnitelná. Selektivita k AChE je spojována především s typem a délkou postranního řetězce u aromatického jádra^{18,25}.

3.2.3 Látky ovlivňující nikotinové receptory

Mezi tuto skupinu látek patří se svým duálním působením galanthamin, epibatidin, fantasmidin, ale i samotný nikotin. U dlouhodobých kuřáků trpících Alzheimerovou chorobou byl prokázán nárůst nikotinových receptorů a několik epidemiologických studií ukázalo na pozdější nástup příznaků demence. Tyto poznatky se staly podnětem k analýze a řadě experimentálních studií, které prokázaly neuroprotektivní působení vůči glutamátové cytotoxicitě, β -amyloidové toxicitě a tvorbě amyloidních plaků. Vzhledem k nežádoucím vedlejším účinkům vyplývajících z neselektivní aktivace všech typů i podtypů nikotinových receptorů je tato látka terapeuticky nevyužitelná²⁶.

Další zajímavou látkou ovlivňující nikotinové receptory je epibatidin, toxin ekvádorské žáby *Epipedobates tricolor* (pralesnička tříbarvá). Tento živočišný alkaloid je velmi specifickým a silným agonistou centrálních nikotinových receptorů. Nejvyšší afinitu vykazuje k podjednotkám 7 α , které mají vztah zejména ke kognitivním funkcím mozku. V současnosti byl izolován ze stejného zdroje nový alkaloid fantasmidin, který je tvořen velmi rigidní tetracyklickou molekulou. Váže se podobně jako epibatidin, avšak specifikuje se na podjednotky 4 β . Vzhledem k omezenému vzorku biologického

materiálu byla vypracována metoda syntetické přípravy fantasmidinu a tím se otevřela cesta k výzkumu jeho dalších farmakologických účinků²⁷.



Obr. 4 Fantasmidin

3.2.4 Látky ovlivňující β -amyloid

Silný antiamyloidní efekt prokazuje kurkumin, látka izolovaná z kořenů a ztlustělých oddenků rostliny *Curcuma longa* z čeledi Zingiberaceae. Kurkumin je součástí tradiční čínské medicíny a indické medicíny Ayurvědy. V lidovém léčitelství se používá při chorobách ledvin, žlučníku a jako stomachikum. Mezi další pozitivní účinky patří protizánětlivý účinek, antioxidační efekt, ochrana jater před toxickým poškozením a zvýšení produkce žluči. Jeho široké spektrum působení umožňuje uvažovat o něm jako o možném léčivu některých neurodegenerativních chorob a některých typů zhoubného bujení. Před časem byla zahájena druhá fáze klinických zkoušek této přírodní látky jako potenciálního léčiva Alzheimerovy choroby²⁸.

3.3 Popis rostlinných taxonů

3.3.1 *Dictamnus albus* L. (třemdava bílá)

Čeleď Rutaceae (Routovité)



Obr. 5 *Dictamnus albus* L.

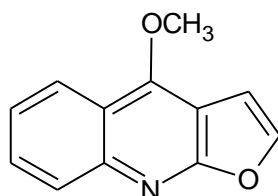
Třemdava bílá je vytrvalá, pomalu kvetoucí statná rostlina, vysoká 40 – 100 cm. Květy jsou souměrné v koncových hroznech, čtyři horní korunní lístky jsou vzpřímené, dolní je skloněný. Barvu květu má růžovou s tmavší žilnatinou (existuje i čistě bílá odrůda). Kvete od května do června, plodem je tobolka. Vyskytuje se v jižní a střední Evropě, Číně, západní a střední Asii. U nás se vyskytuje v teplých oblastech velmi roztroušeně (Pálava). Roste v pásmu od nížiny po pahorkatinu, ve světlých lesích a lesostepích. Třemdava bílá patří k ohroženým druhům²⁹.

Mezi obsahové sloučeniny patří furanokumarin xanthotoxin, benzofuranové glukosidy knidiosid A, methylknidiosid A, knidiosid B, methylester knidiosidu B a flavonové glykosidy rutin, isorhamnetin-3-*O*- β -D-rutinosid a kaempferol-3-*O*- β -D-rutinosid³⁰.

Další důležitou složkou jsou furochinolinové (furanochinolinové) alkaloidy, které byly izolovány z kůry kořenů rostliny. Prozatím bylo nalezeno pět alkaloidů, diktamnin, γ -fagarin, skimmianin, robustin a haplopin³¹.

Diktamnin je údajně toxická sloučenina. Prokázaná letální dávka u myši je 0,05 – 0,055 mg. Farmakologické účinky alkaloidu jsou závislé na použité koncentraci. V koncentraci 1:1000000 nepatrně zvyšuje tonus srdeční svaloviny, v 1:2500 se projevil

jako silný vasokonstriktor na izolovaném krysím uchu. Další efekty byly zkoumány na děložním svalu morčete a krysy v koncentraci 1:250000. K posouzení všech účinků jsou nutné další klinické studie³². Ačkoliv je uváděna toxicita u tohoto alkaloidu, vykazuje látka *in vitro* určité neuroprotektivní účinky (viz druh *D. dasycarpus*).



Obr. 6 Diktamnin

3.3.2 *Dictamnus dasycarpus* L. (třemdava huňatoplodá)

Čeleď Rutaceae (Routovité)



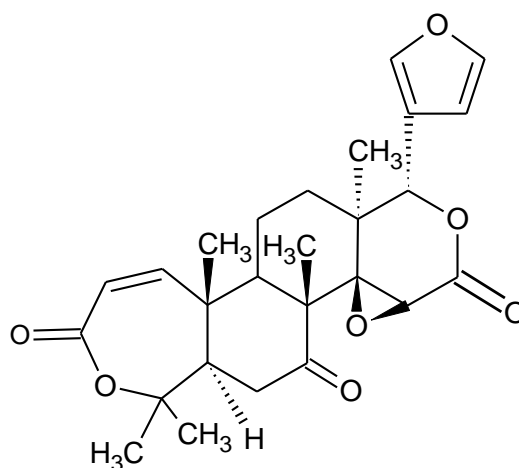
Obr. 7 *Dictamnus dasycarpus* L.

Rostlina dorůstá výšky 40 – 100 cm. Mladé výhonky, listy a květy jsou umístěny po lodyze řídce. Na povrchu listu jsou rozmístěny průsvitné mazové žlázky. Listy mají eliptický, podlouhlý nebo vejčitý tvar a jsou přisedlé těsně k lodyze. Hroznovité květenství je uzpůsobené z květů do elipsoidního tvaru. Okvětní plátky kopinatého tvaru mají narůžovělé bílou až růžovou barvu s fialovými proužky uvnitř. Doba květu je od května do srpna. Nejčastěji se vyskytuje na svazích, v houštinách a travnatých otevřených lesích na Dálném východě³³.

Dictamnus dasycarpus se používá pod názvem Bai-Xian-Pi v tradiční čínské medicíně na léčbu žloutenky, kašle, revmatismu a některých kožních onemocnění. Provedlo se mnoho pokusů s lipofilními komponenty rodu *Dictamnus* a výsledkem byla izolace účinných látek.

Různorodou skupinu obsahových sloučenin tvoří furochinolinové (furanochinolinové) alkaloidy, limonoidy a seskviterpeny. Z kůry kořenů bylo nově získáno 5 seskviterpenových glykosidů pojmenovaných diktamnosidy A – E³⁴. Z alkaloidů byly v kůře kořenů zastoupeny diktamnin, haplopin, skimmianin, γ -fagarin a limonoidy obakunon, fraxinellon atd³⁵.

Neuroprotektivní charakter byl prokázán u alkaloidů diktamninu a haplopinu, ale i u limonoidů obakunonu a degradovaného fraxinellonu. Výzkum probíhal na hipokampálních buňkách laboratorních myší, kde obakunon v koncentraci 100 – 150 μ M prokázal protektivní efekt vůči neurotoxickému působení glutamátu. Tento výsledek svědčí o tom, že obakunon by mohl být potenciálním kandidátem na léčbu neurologických onemocnění, které jsou podmíněné oxidačním stresem³⁵. Obsahové látky kůry kořenů vykazují údajně neuroprotektivní účinky na kulturách hipokampálních buněk myší (snížení glutamátové neurotoxicity)³⁶.



Obr. 8 Obakunon

3.3.3 *Evodia rutaecarpa* L. (evodie routoplodá)

Čeleď Rutaceae (Routovité)



Obr. 9 *Evodia rutaecarpa* L.

Evodia rutaecarpa je strom pěstovaný zejména v Číně a na Korejském poloostrově. V Japonsku nebo v Austrálii introdukovan. Po více než 2000 let je nedílnou součástí tradiční čínské medicíny, ve které se používají drobné červenohnědé plody sbírané v letních měsících³⁷.

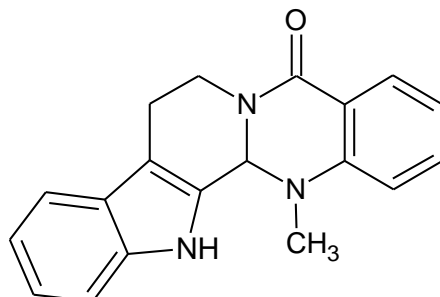
Sušené plody se používají celé i drcené, nejčastěji ve formě odvarů. Moderní medicína prozatím studuje farmakologické účinky drogy a její další možné využití v humánní medicíně. Ve formě doplňků stravy je součástí přípravků k redukci hmotnosti³⁸.

Hlavní obsahové látky jsou chinazolinkarbolinové alkaloidy evodiamin, dehydroevodiamin, rutekarpin a jeho metabolit 10-hydroxyrutekarpin, wuchuyin, rhetsinin a chinolinové alkaloidy evokarpin, dihydroevokarpin. Dalšími složkami jsou flavonoidy a limonoidy, které jsou s největší pravděpodobností také biologicky aktivní^{39,40}.

Indolopyridochinazolinový alkaloid rutekarpin prokázal účinky na kardiovaskulární systém, mezi něž patří nejen efekty inotropní a chronotropní, ale i účinky vasorelaxační, antiagregační, protizánětlivé, analgetické, termoregulační a protirakovinové^{41,42}.

Cytotoxické efekty má i alkaloid evodiamin, jehož schopností je indukovat apoptózu u všech typů karcinomů, avšak nejvyšší efekt byl prokázán u buněk žaludku. Evodiamin může ovlivnit i progresi Alzheimerovy choroby. Studie probíhaly na transgenních myších rozdělených do dvou skupin. Jedné skupině se podávala dávka 100 mg/kg, druhé 50 mg/kg. K porovnání farmakologických účinků bylo použito léčivo Aricept a jako kontrolní skupina sourozenci netransgenních myší. Po 4 týdnech léčby se hodnotila schopnost učení a paměti. Dávka 100 mg/kg výrazně zmírnila degeneraci kognitivních

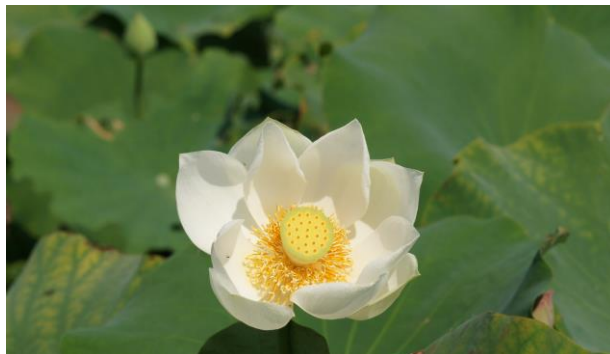
procesů. Dalším efektem bylo zmírnění inhibice vychytávání glukózy, ale byla také snížena exprese zánětlivých markerů IL-1 β , IL-6, TNF- α a COX-2. Výsledky studií poukazují na potenciální směr vývoje nových léčiv Alzheimerovy demence^{43,44}.



Obr. 10 Evodiamin

3.3.4 *Nelumbo nucifera* L. (Lotos indický)

Čeleď Nelumbonaceae (Lotosovité)



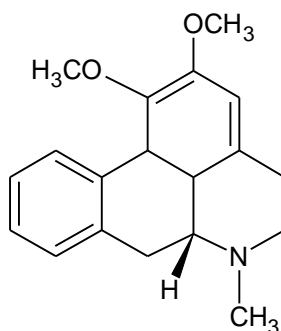
Obr. 11 *Nelumbo nucifera* L.

Lotos indický (ořechodárný) se vyskytuje v oblasti jihozápadní Asie až po Filipíny a Austrálii, další naleziště byla objevena v Evropě v jižním Povolží a termálních pramenech v Rumunsku. *Nelumbo nucifera* je vytrvalá vodní bylina s větvenými oddenky, ze kterých vyrůstají střídavé listy. Na konci sezóny se na vrcholu oddenku vytvářejí hlízovité zásobní orgány. Velké květy jsou jednotlivě umístěny na dlouhých stvolech a mají bílou, bledě žlutou, ale také růžovou barvu. Plody jsou nepukavé oříšky, semena mají velké embryo a tenký endosperm. Stanoviště charakteristické pro lotosy jsou stojaté a pomalu tekoucí mělké vody subtropů a tropů⁴⁵.

Mezi obsahové látky patří řada zcela běžných flavonoidů, polyfenolické katechiny a alkaloidy s dvěma různými strukturními základy. Největší zastoupení mají bisbenzylisochinolinové alkaloidy, mezi něž patří nelumboferin, nelumborin A, nelumborin B a hlavní biologicky aktivní alkaloid neferin. Strukturně podobné neferinu jsou alkaloidy linesinin a isolinesinin. Druhou skupinou alkaloidů jsou aporfinové alkaloidy se zástupci *N*-methylassimilobinem, nuciferinem a nornuciferinem^{46,47,48}.

Tato aporfinová skupina byla izolovaná z listů rostliny a podle výsledků studií prokazovala inhibiční aktivitu vůči AChE. Nejsilnějším inhibitorem se jevil *N*-methylassimilobin, jehož aktivita vůči AChE dosahovala v koncentraci 1,5 mg/ml 50 %. Mechanismus inhibice probíhal nekompetitivně a reversibilně. Alkaloidy nuciferin a nornuciferin prokazovaly oproti *N*-methylassimilobinu cholinesterasovou aktivitu nižší⁴⁸.

Farmakologicky zajímavý je také alkaloid neferin. Testy byly provedeny na zvířatech, u kterých byla navozena pomocí skopolaminu ztráta paměti. Po podání neferinu došlo k výraznému zlepšení kognitivních funkcí. Neferin rovněž prokázal pozoruhodnou inhibiční aktivitu proti peroxidaci lipidů a i v antioxidačních studiích prokázal dobré výsledky⁴⁹.



Obr. 12 Nuciferin

3.3.5 *Phellodendron chinensis* L. (korkovník čínský)

Čeleď Rutaceae (Routovité)

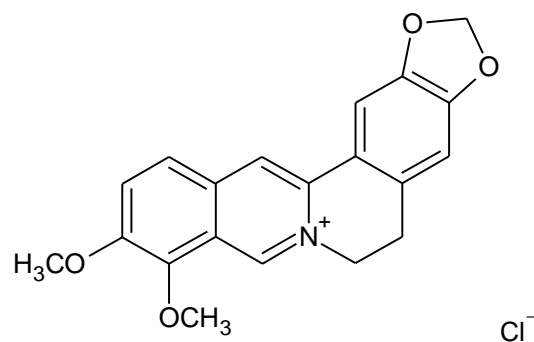


Obr.13 *Phellodendron chinensis* L.

Korkovník čínský je dvoudomý opadavý strom dorůstající výšky 10 m. Koruna je široce rozložená, tenká borka má šedozelenou až šedohnědou barvu. Letorosty jsou barvy červenohnědé až šedohnědé. Vejčité, někdy také kopinaté listy jsou utvořené ze 7 – 13 zašpičatělých lístků. Lícová strana lístků je tmavě žlutozelená a rubová strana měkce chlupatá. Květy jsou složeny do kuželovitých lat, plody mají barvu černou a jsou velké zhruba 9 mm. Nejčastěji se vyskytuje ve střední Číně⁵⁰.

Nejrozšířenější skupinou obsahových látek jsou protoberberinové alkaloidy. Největší zastoupení má alkaloid berberin, v menším množství jsou obsaženy palmatin, jatrorrhizin, felodendrin a magnoflorin. Berberin se používá v tradiční čínské medicíně. Jeho účinky jsou protizánětlivé, antimikrobní a protinádorové. Nové studie prokázaly vliv berberinu na hepatomové buňky HepG2, u kterých prokázal schopnost indukovat apoptózu, která byla zprostředkovaná oxidačním poškozením^{51,52}.

Nejaktuálnější klinické studie probíhají s ethanolovým extraktem kůry korkovníku a jsou zaměřeny na neuroprotektivní účinky obsahových látek. Experiment probíhá v PC12 buňkách (buněčná linie odvozená z feochromocytomu krysí dřeně nadledvin). PC12 buňky jsou ošetřeny nervovým růstovým faktorem, poté dojde k vytvoření linie buněk, která slouží jako modelový systém pro diferenciaci nervových buněk. Na takto upravených buňkách je indukována neurotoxicita. Testování je zaměřeno na ochranný efekt účinných látek proti β -amyloidu; výsledky se jeví nadějně. Vlivem potlačení apoptózy zde dochází k částečnému neuroprotektivnímu působení a ke zvýšení životaschopnosti buněk⁵³. Je však nutné vzít v úvahu, že se jedná o specifický modelový test, bude nutné prokázat přestup přes hematoencefalickou bariéru.



Obr.14 Berberin

3.3.6 *Zanthoxylum bungeanum* L. (žlutodřev bungeův)

Čeleď Rutaceae (Routovité)



Obr. 15 *Zanthoxylum bungeanum* L.

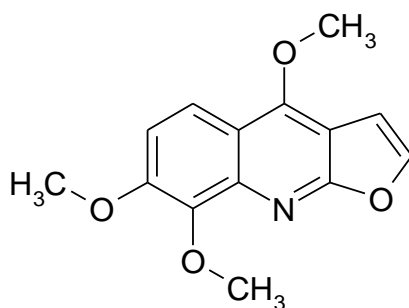
Žlutodřev je jednou z mnoha rostlin používaných v tradiční čínské medicíně. Především kůra stromu se používala na utišení bolesti zubů, kolik různého původu a revmatické stavy. V dnešní době se některé druhy rodu *Zanthoxylum* pěstují jako okrasné bonsaje⁵⁴.

Jedná se o opadavý strom, který dorůstá výšky 3 – 7 m. Naleziště se nacházejí především v asijské oblasti (Anhui, Fujian, Sichuan, Bhútán, atd.) pod hranicí 3 200 metrů. Z kmínků i větví vyrůstají malé ostny, listy jsou složeny z 5 – 13 přisedlých vejčitých lístků se zubatým okrajem. Vřetenovité květenství je složeno ze žlutozelených květů.

Sušené plody jsou nachově červené barvy a používají se jako koření obzvláště v sečuánské kuchyni jako tzv. sečuánský pepř⁵⁵.

Rozmanitost obsahových látek není příliš vysoká, největší podíl zde mají především alkaloidy a lignan sesamin, který je společný celému rodu *Zanthoxylum*. Hlavní složkou izolovanou z kořene rostliny je pyrano-2-chinolonový alkaloid zanthobungeanin. V menším množství byly zastoupeny také alkaloidy benzofenanthridinové (11-methoxychelerythrin, des-*N*-methylchelerythrin), furochinolinové (skimmianin), amottianamid a novinkou izolovanou poprvé z kořene rostliny je sloučenina 1-*N*-acetylanonain. Své zastoupení v obsahových látkách má i steroid β -sitosterol. Získané sloučeniny vykazovaly širokospektré antimykotické účinky, avšak jejich aktivita byla velmi slabá^{56,57}.

Farmakologicky slibně se jeví směs extraktů z oplodí *Zanthoxylum bungeanum*, plodů *Cnidium*, kořenů *Sophora flavescens* a kořenů *Phenodendron*. Tato směs dokáže snížit pH pochvy při vaginálních zánětech a prokazuje také antimikrobiální aktivitu. Jedná se o možnou alternativu v léčbě gynekologických onemocnění⁵⁸.



Obr. 16 Skimmianin

3.3.7 *Zanthoxylum nitidum* L. (žlutodřev lesklý)

Čeled' Rutaceae (Routovité)

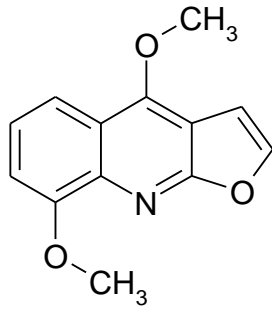


Obr. 17 *Zanthoxylum nitidum* L.

Zanthoxylum nitidum, nazývaný v Assamese Tez-mui, je velký pichlavý keř. Ve většině oblastí svého výskytu má rozmanité morfologické proměny. Rozšířený je převážně v jihovýchodních asijských zemích, v severní Austrálii a v severovýchodní Indii (Assam, Sikkim a Nagaland). V Indii se celá rostlina hojně používá v léčitelství. Kořen se užívá na snížení bolesti zubů, při horečce a revmatismu, plody převážně na žaludeční problémy a větvičky nebo kůra z nich na léčbu cholery. Extrakty z celé rostliny prokazují i antibakteriální účinky⁵⁹.

Listy jsou složeny z mnoha malých oválných lístků, zelenožluté květy se vyskytují v paždí listů. Plodem je červenohnědý měchýřek⁶⁰.

Z hlediska obsahových látek je *Zanthoxylum nitidum* bohatý. Obsaženy jsou v něm převážně různé typy alkaloidů, flavonoidy, amidy kyselin a lignany. Extrakty z rostliny vykazují širokou účinnost, především se jedná o efekty antibakteriální, antimykotické, cytotoxické a antivirotické. Největších farmakologických účinků dosahují především alkaloidy diktamnín, 5,6-dihydro-6-methoxynitidin, γ -fagarin, skimmianin a 5-methoxydiktamnín. Nejnovější poznatky o extraktech rodu *Zanthoxylum* prokazují také anticholinergní efekt. Především se jedná o furochinolinový alkaloid skimmianin, jehož aktivita v této oblasti dosahovala v porovnání s fysostigminem nejlepších výsledků^{61,62,63}.



Obr. 18 γ -Fagarin

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Obecné metody

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna rozpouštědla byla přečištěna destilací komerčních rozpouštědel. Po zachycení a odstranění destilačního předku byla jímána podle tabelárně stanovené teploty varu hlavní frakce.⁶⁴ Tímto procesem bylo predestilováno max. 90 % objemu rozpouštědla. Čistá rozpouštědla byla uchována v hnědých zásobních lahvích.

4.1.2 Odpaření extraktů a jejich uchování

Extrakty vzorků drog byly odpařovány na vakuové odparce při maximální teplotě 40 °C. Připravené odparky extraktů (ethanolové – sumární a ethyl-acetátové – alkaloidní) určené ke změření biologické aktivity byly přeplněny do injekčních ampulek o objemu 5 ml a následně odpařovány. Odpařování probíhalo na vodní lázni při teplotě do 60 °C v proudu filtrovaného vzduchu. Po odpaření rozpouštědla byly ampulky dále sušeny ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem. Po vysušení byl obsah ampulek naplněn argonem, ampulky zataveny a do doby analýzy uchováván při teplotě -22 °C.

4.1.3 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pro screening byl získán nákupem dle následujících údajů:

Tab. 1 Přehled rostlinného materiálu

Označ.*	Taxon	Morfol. část	Původ	Hmotnost**
AL-236	<i>Dictamnus albus</i>	kořen	Kottas Wien, 11-03-30	50 g
AL-241	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	kůra kořenů	Pragon Praha, 11-04-05	15 g
AL-229	<i>Evodia rutaecarpa</i>	plod	Pragon Praha – Wuzhuyu, 11-04-05	15 g
AL-240	<i>Nelumbo nucifera</i>	embryo	Pragon Praha – Lianzixin, 11-04-05	15 g
AL-246	<i>Nelumbo nucifera</i>	semena	Pragon Praha – Lianzi, 11-04-05	15 g

Tab. 1 pokračování

Označ.*	Taxon	Morfol. část	Původ	Hmot- nost**
AL-248	Nelumbo nucifera	list	Pragon Praha – Heye, 11-04-05	10 g
AL-249	Nelumbo nucifera	tyčinky	Pragon Praha – Lianxu, 11-04-05	15 g
AL-234	Phellodendron chinense	kůra	Pragon Praha – Huang ba, 11-04-05	15 g
AL-232	Zanthoxylum bungeanum	oplodí	Pragon Praha – Hua jiao, 11-04-05	80 g
AL-231	Zanthoxylum nitidum	dřevo	Pragon Praha – Rudijinniu, 11-04-05	15 g

* číslo vzorku z katalogizace pracovní skupiny ADINACO Group

** hmotnost vzorku použitá k extrakci

4.1.4 Příprava extraktů⁶⁵

Suchá rostlinná část byla rozemleta na drobné částice velikosti cca 1 – 2 mm. Rozdrobněná a navážená droga byla vsypána do Erlenmayerovy baňky a přelita 95% ethanolem (EtOH). Droga byla ponořena celá a nad ní bylo alespoň 3 cm kapaliny. Do baňky byl přidán varný kamínek a droga byla podrobena extrakci EtOH na vodní lázni 15 minut od začátku varu. Poté byla baňka vyjmuta z vodní lázně a ponechala se zchladnout. Přibližně po 15 minutách droga sedimentovala a zbylá tekutina byla přefiltrována přes silnější vliselinový filtr. Vyvaření bylo opakováno ještě dvakrát. Následně bylo k sedimentu v baňce přidáno takové množství EtOH, aby byla matolína překryta pouze rozpouštědlem. Vzniklá suspenze byla sonikována v ultrazvukové lázni SONOREX 10 minut při normální teplotě a stupni sonikace 10. Směs byla opět přefiltrována přes vliselin. Spojené filtráty byly přefiltrovány ve filtračním tubusu přes vrstvu křemeliny (1 cm). Čirý filtrát byl zahuštěn na vakuové odparce přibližně na desetinu objemu. Pasteurovou pipetou bylo odebráno do odvážené ampulky tolik roztoku, aby po odpaření vážil odparek cca 50 mg. Extrakt byl odpařen obvyklým způsobem (vháněním filtrovaného vzduchu) při max. 50 °C. Odparek byl zvážen (označení odparku S).

Hlavní část ethanolového extraktu v baňce (zbytek) byla zahuštěna do řídkého stavu, poté bylo přidáno cca 10 ml vody a přebytečný EtOH byl odpařen na odparce. Vzniklá suspenze byla smíchána s 10 – 20 ml 2% H₂SO₄. Baňka se suspenzí byla umístěna do ultrazvukové lázně SONOREX a byla sonikována přibližně 5 minut při normální teplotě a stupni sonikace 10. K zamezení ulpívání částic na stěnách baňky bylo nutné s baňkou v lázni občas kroužit. Kalná tekutina byla přefiltrována v malém tubusu přes vrstvu křemeliny (cca 5 mm). Tato filtrační vrstva s křemelinou byla nejdříve promyta vodou. Baňka byla poté vypláchnuta 10 ml vody a následně byl tento výplach zfiltrován přes stejný tubus. Získaný roztok musel být čirý, nikoliv kalný. Čirý kyselý filtrát byl doplněn vodou na objem 40 – 50 ml a poté byl dvakrát vytřepán ¼ svého objemu predestilovaným a Et₂O pro odstranění nežádoucích látek (lipidy, silice, atd.). Etherová vrstva byla ostře oddělena a následně odstraněna. Kyselá vodná vrstva byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH přibližně 10 (pH papírek) a vytřepána třikrát ¼ svého objemu predestilovaným ethyl-acetátem (EtOAc). Ethyl-acetátová fáze byla ostře oddělena. Organické výtřepky byly spojeny v zabroušené baňce minimální velikosti, do baňky bylo přidáno malé množství (2 – 5 g) bezvodého Na₂SO₄ a roztok byl vysušen. Přibližně po 30 minutách byl ethyl-acetátový roztok alkaloidů zfiltrován ve filtračním tubusu přes malou vrstvu vaty. Čirý filtrát byl odpařen na vakuové odparce při teplotě max. 40 °C dosucha. Po zjištění hmotnosti byl odparek rozpuštěn v malém množství EtOAc a rozdělen podle potřeby do injekčních ampulek. Po odstranění rozpouštědla v proudu vzduchu byly ampulky vysušeny ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem po dobu minimálně 16 hodin a poté zváženy (označení odparku B).

4.1.5 Chemikálie, rozpouštědla a přístroje pro přípravu extraktů

Rozpouštědla:

Diethylether č. destilovaný bez stabilizátoru (Et₂O)

Ethanol č. 95%, denaturovaný methanolem (EtOH)

Ethyl-acetát č. (EtOAc)

Chemikálie:

Argon

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

Kyselina sírová 2% (w/w)

Silikagel (sušící perly)

Síran sodný bezvodý č.

Uhličitan sodný 10% roztok (w/w)

Přístroje:

Ultrazvuková lázeň SONOREX 10P

Vakuová odparka Büchi

4.2 Stanovení cholinesterasové aktivity

4.2.1 Chemikálie, materiál, přístroje

Chemikálie:

Acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použit 10mM roztok)

Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich) (použit 10mM roztok)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Adrich) (použit 5mM roztok)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

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

Pufry:

5mM Fosfátový pufr pH 7,4

Zásobní roztok A

10 mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH_2PO_4).

Zásobní roztok B

10 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g Na_2HPO_4).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody.

5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml.

100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

Zásobní roztok A

200mM roztok NaH_2PO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g NaH_2PO_4).

Zásobní roztok B

200 mM roztok Na_2HPO_4 (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na_2HPO_4).

Smíchá se 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody

Přístroje:

Centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50

Centrifuga Boeco U-32R, rotor Hettich 1611

Reader Synergy HT (BioTek)

Biologický materiál:

Zdrojem AChE byla pouzdra lidských erytrocytů. Jako zdroj BuChE byla použita lidská plazma.

Z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků byla připravena erytrocytární pouzdra. K odebrané krvi byl přidán 1 ml citrátu sodného na 9 ml krve podle upravené metody Stecka a Kanta⁶⁶. Z plné krve byla centrifugací odstraněna plazma při rychlosti 4000 ot.min⁻¹ při teplotě 10 °C za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přeplněny do 50ml zkumavek a třikrát promyty 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot.min⁻¹, centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot.min⁻¹ při teplotě 10 °C a vzniklá pouzdra byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

Po odstranění erytrocytů byla získána plazma s obsahem BuChE.

4.2.2 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity (IC_{50})

Pro získání hodnoty IC_{50} byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)⁶⁷. Jako substráty byly použity estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se navázala na DTNB za vytvoření žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm (Reader Synergy HT). Byl pozorován nárůst absorpance za 1 minutu.

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Inhibiční aktivita byla porovnána s hodnotami IC_{50} referenčních látek galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice

(% I) byla spočítána 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.

4.2.3 Metodika stanovení inhibiční aktivity

Do mikrotitrační destičky byla napipetováno do 3 jamek vždy jedna koncentrace roztoku extraktu (celkem 5 koncentrací v mg/ml: 20,0; 2,0; 0,2; 0,02; 0,002), do poslední bylo napipetováno DMSO. Reakční směs obsahovala: 8,6 μ l roztoku (suspenze) enzymu (erytrocytárních pouzder), 283 μ l roztoku DTNB a 8,3 μ l roztoku určité koncentrace extraktu. Po 5minutové inkubaci bylo přidáno 33,3 μ l roztoku acetylthiocholinujodidu nebo butyrylthiocholinujodidu a po této době měřena absorbance (v případě inhibice AChE při 436 nm, v případě inhibice BuChE při 412 nm) v kinetickém modu po dobu 1 minuty.

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Výsledné hodnoty byly porovnány s hodnotami referenčních látek (galanthaminem, huperzinem A, eserinem, tab. 4). Statistické hodnocení (3 měření) se provede pomocí programu Excel.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení hodnot IC₅₀

Tab. 2 Cholinesterasová aktivita ethanolových extraktů (extrakty S)

Číslo	Taxon – morfol. část	IC ₅₀ AChE (μg/ml)	IC ₅₀ BuChE (μg/ml)
AL-236	<i>Dictamnus albus</i>	> 500	> 500
AL-241	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	> 500	> 500
AL-229	<i>Evodia rutaecarpa</i>	90,2 ± 11,1	5,2 ± 0,6
AL-240	<i>Nelumbo nucifera</i> – embryo	> 500	180,8 ± 20,2
AL-246	<i>Nelumbo nucifera</i> – semena	> 500	> 500
AL-248	<i>Nelumbo nucifera</i> – list	430,1 ± 61,3	212,6 ± 24,8
AL-249	<i>Nelumbo nucifera</i> – tyčinky	> 500	> 500
AL-234	<i>Phellodendron chinense</i>	2,2 ± 0,2	59,7 ± 6,4
AL-232	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	453,7 ± 78,5	179,4 ± 28,1
AL-231	<i>Zanthoxylum nitidum</i>	458,2 ± 80,4	298,4 ± 33,6

Tab. 3 Cholinesterasová aktivita ethyl-acetátových extraktů (extrakty B)

Číslo	Taxon – morfol. část	IC ₅₀ AChE (μg/ml)	IC ₅₀ BuChE (μg/ml)
AL-236	<i>Dictamnus albus</i>	> 500	62,6 ± 6,1
AL-241	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	439,0 ± 45,7	64,8 ± 6,7
AL-229	<i>Evodia rutaecarpa</i>	9,8 ± 0,9	9,7 ± 0,9
AL-240	<i>Nelumbo nucifera</i> – embryo	45,9 ± 4,1	11,6 ± 1,1
AL-246	<i>Nelumbo nucifera</i> – semena	> 500	233,7 ± 24,2
AL-248	<i>Nelumbo nucifera</i> – list	59,2 ± 6,0	24,1 ± 2,5
AL-249	<i>Nelumbo nucifera</i> – tyčinky	> 500	190,5 ± 18,5
AL-234	<i>Phellodendron chinense</i>	17,9 ± 1,9	52,3 ± 5,7
AL-232	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	246,3 ± 22,2	29,7 ± 2,9
AL-231	<i>Zanthoxylum nitidum</i>	82,4 ± 8,4	60,3 ± 6,0

Tab. 4 IC₅₀ referenčních látek

Látka	IC ₅₀ AChE (μg/ml)	IC ₅₀ BuChE (μg/ml)
Galanthamin	0,491 ± 0,019	12,155 ± 0,373
Huperzin A	0,080 ± 0,0002	> 0,242

6 DISKUSE

Pro screening inhibiční aktivity jsem ve svojí práci použila především morfologické části rostlin z čeledi Rutaceae a jednoho zástupce z čeledi Nelumbonaceae. Z převážné části jde o rostliny farmaceuticky nebo toxikologicky významné, které jsou používány především v tradičních fototerapeutických systémech v Asii.

Čeleď *Rutaceae* má velmi pestrou škálu svých zástupců rozšířených po celém světě. Nacházejí zde široké uplatnění jako analgetika, antirevmatika, zdroje antimikrobně účinných látek a také látek působících protinádorově; např. *Zanthoxylum nitidum* se stále intenzivně používá v indickém lidovém léčitelství⁵⁹. *Zanthoxylum bungeanum* poskytující tzv. sečuánský pepř, je rostlina využívanou v tradiční čínské medicíně. *Dictamnus albus*, který se vyskytuje na teritoriu Evropy je rostlinou spíše chráněnou v lokalitách přírodního výskytu²⁹ v evropské fytoterapii svoje místo nemá. Údaje o její toxicitě jsou známy už delší dobu⁶⁸. Naopak *Dictamnus dasycarpus* je ve východní medicíně využíván poměrně hojně, jak bylo v dřívější části textu této práce uvedeno. Rovněž tak velmi známými a používanou rostlinami (v tradiční čínské medicíně) jsou *Evodia rutaecarpa* a *Phellodendron chinensis*. V tradiční čínské medicíně jsou rovněž používány různé morfologické části lotosu, *Nelumbo nucifera*.

V tomto screeningovém systému jsem použila dva typy extraktů; jen tak je možné při porovnání jejich aktivit posoudit, zda je inhibiční účinek na AChE a BuChE způsoben alkaloidy anebo také jinými, nealkaloidními látkami. Pro přípravu sumárních ethanolových extraktů (S) a extraktů alkaloidních (B) jsem využila standardní metodu pracovní skupiny ADINACO Research Group z katedry farmaceutické botaniky a ekologie.

Při porovnání výsledků inhibiční aktivity jednotlivých typů extraktů se ukázalo, že nepřehlédnutelnou inhibiční aktivitu vykazují jen dvě rostliny: *Evodia rutaecarpa* a *Phellodendron chinense*.

U rostliny *Evodia rutaecarpa* je tento fakt popisován; přítomný evodiamin je z hlediska inhibiční aktivity nejvýznamnějším alkaloidem izolovaným z rostliny. Podle výsledků doposud známých studií došlo ke zmírnění degenerace kognitivních funkcí^{43,44}. Je však zajímavé, že literatura popisuje inhibiční účinek vůči AChE, v tomto případě však byla vyšší inhibice v případě BuChE. K této aktivitě může přispět účinek rutaekarpinu a dalších alkaloidů. Protože je však aktivita tohoto sumárního extraktu vyšší než u extraktu alkaloidního, zdá se, že se na účinku podílejí ještě nějaké další látky nealkaloidního charakteru.

Phellodenron chinense obsahuje protoberberinové baze především kvartérního charakteru (berberin, palmatin, jatrorrhizin a další). Inhibiční účinek berberinu byl publikován několikrát, např.⁶⁹ (IC₅₀: AChE 0,70 ± 0,10 μM; BuChE 30,7 ± 3,5 μM). Tyto hodnoty plně korelují s nalezeným výsledkem v mé práci, resp. svědčí o tom, že biologická aktivita látek v extraktu z korkovníku je způsobena kvartérními protoberberinovými bazemi, i když se zde mohou uplatnit další látky (viz dále).

U ethanolových extraktů z ostatních morfologických částí studovaných rostlin nebyla inhibiční aktivita významná.

V případě alkaloidního extraktu (B) se inhibiční aktivita objevila výraznějším způsobem. Významné jsou však jen taxony *Evodia rutaecarpa* a *Nelumbo nucifera* (embryo a list), zajímavý je výsledek u *Phellodendron chinense* a málo významné jsou aktivity u obou zástupců rodu *Dictamnus* a *Zanthoxylum*.

U *Evodia rutaecarpa* je patrné, že inhibice AChE je způsobena s největší pravděpodobností alkaloidy; v případě inhibice BuChE je však zřejmé, že se na tomto účinku podílely ještě nějaké další nealkaloidní látky (porovnání tab. 2, tab. 3).

Zajímavé jsou výsledky z jednotlivých morfologických částí *Nelumbo nucifera*, z jehož listů byly izolovány aporfinové alkaloidy *N*-methylnuciferin, nuciferin a nornuciferin. Tyto struktury podle studií prokazují významnou inhibiční aktivitu, nejsilnějším inhibitorem se jevil *N*-methylnuciferin^{46,47,48}. Pozoruhodné inhibiční výsledky prokázal i hlavní bisbenzylisochinolinový alkaloid *Nelumbo nucifera* neferin⁴⁹. V případě této rostliny je však obtížné určit, který alkaloid(y) může být za inhibici zodpovědný. Biologická aktivita jednotlivých alkaloidů je sice známa, i když je obtížně porovnatelná, protože některé testy nebyly prováděny na lidské AChE a BuChE, ale v případě vzorků, které jsem zpracovávala jsem neznala obsah jednotlivých alkaloidů v příslušných drogách z *Nelumbo nucifera*, a proto nelze provést jednoznačný závěr.

U druhu *Phellodendron chinense* se zdá, že na inhibičním účinku vůči AChE se podílejí i nealkaloidní látky, jak je vidět z hodnot IC₅₀. Tento rozdíl však není tak výrazný, aby stálo za to jej blíže experimentálně studovat.

V morfologických částech *Dictamnus albus* a *Dictamnus dasycarpus* jsou přítomny především furochinolinové (furanochinolinové) alkaloidy, které nebyly dosud významně studovány. Je sice pravda, že u diktamninu a skimmianinu byly nalezeny určité neuroprotektivní účinky³⁶, nejedná se však o bezprostřední inhibiční účinky AChE nebo BuChE, resp. alosterickou modulaci receptorů. Údaje o toxicitě těchto alkaloidů jsou starého data a je otázkou, zda by v současnosti z vědeckého hlediska obstály; rozhodně

je nutné jejich revize. Dá se však předpokládat, že jejich toxicita bude vyšší než toxicita běžných isochinolinových alkaloidů.

Podobný stav se vyskytuje u zástupců rodu *Zanthoxylum*; obsahují různé typy alkaloidů, které sice nebyly studovány v potřebné šíři na inhibici AChE a BuChE, ale zdá se, že to není ani potřebné. Hodnota IC_{50} , která je vyšší než 30 $\mu\text{g/ml}$ nenasvědčuje, že případně izolované látky budou mít významnou inhibiční aktivitu.

Z nalezených výsledků mé práce vyplývá, že zajímavým objektem pro další studium může být embryo a list *Nelumbo nucifera*. Hodnoty inhibice jsou zajímavé obzvláště v případě inhibice BuChE. Zabývat se těmito látkami by bylo jistě velmi prospěšné, ale vyskytuje se zde jeden technický problém: ačkoliv jsou uvedené rostlinné části běžně používanými léčivými drogami v oblasti tradiční čínské medicíny a v čínské komerční sféře jsou dostupné, bývá jejich kvalita velmi nevyrovnaná. To lze zjistit především v případě listů, které nebývají vždy správně sušeny (což lze poznat už vizuálně) a mohou se u nich vyskytnout i jiné vegetabilní příměsi, které mohou komplikovat výsledky předběžných biologických testů a tím vlastně postavit tuto rostlinu na okraj zájmu z hlediska uvedeného studia.

7 LITERATURA

1. Šíma P.: Civilizační nemoci aneb Nemoci západního životního stylu, *Lék. listy* 16 (2009).
2. Pidrman V.: *Demence*. Grada Publishing, Praha 2007.
3. Jiráček R. a kol.: *Demence a jiné poruchy paměti*. Grada Publishing, Praha 2009.
4. Holmerová I.: Možnosti prevence kognitivní poruchy a demence. *Practicus* 4, 21 – 26 (2011).
5. Kučerová H.: *Demence v kazuistikách*. Grada Publishing, Praha 2006.
6. Anděl R., Vaňková H.: Strategie v prevenci demence. *Čes. ger. rev.* 7, 76 – 77 (2009).
7. Fišar Z. a kol.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Grada Publishing, Praha 2009.
8. Bartoš A., Řípková D.: Pokroky v diagnostice Alzheimerovy nemoci. *Psych. pro praxi* 1, 17 – 21 (2007).
9. Jiráček R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurol. pro praxi* 2, 101 – 105 (2002).
10. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. pro praxi* 2, 107 – 111 (2007).
11. Sheardová K.: Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Česk. Slov. Neurol. N* 70/103, 589 – 594 (2007).
12. Holmerová I. a kol.: Nové směry farmakoterapie syndromu demence a poruch kognitivních funkcí. *Vnitř. Lék.* 11, 57 (2011).
13. Vališ M., Kalnická D.: Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurol. pro Praxi* 12, 34 (2011).
14. Švestka J.: Memantin- necholinergní alternativa léčby Alzheimerovy a vaskulární demence. *Psych. pro Praxi* 3, 154 – 159 (2004).
15. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 5, 344 (2009).
16. Švestka J.: Galantamin - duální kognitivum s neuroprotektivním účinkem Update. *Psychiatrie* 8, 304 (2005).
17. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Voj. zdrav. listy* 1, 38 (2003).
18. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékař. 7*, 40 - 44 (2011).
19. Elgorashi E. E., Stafford G. I., Van Staden J.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 70, 260 – 262 (2004).

20. Pagliosa L. B. a kol: Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine* 17, 698 – 701 (2010).
21. Drtinová L., Pohanka M.: Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chem. Listy* 107, 12 – 15 (2013).
22. Wang R., Yan H., Tang X. C.: Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1 – 26 (2006).
23. Patočka J.: Natural cholinesterase inhibitors from mushrooms. *Mil. Med. Sci. Lett.* 81, 40 – 44 (2012).
24. Danuello A., Romeiro N. C., Giesel G. M. a kol: Molecular docking and molecular dynamic studies of semi-synthetic piperidine alkaloids as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Brazil. Chem. Soc.* 23, 163 – 170 (2012).
25. Pan L., Jia-Heng H., Jin-Qiang H. a kol: Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 18, 3790 – 3793 (2008).
26. Nikotinové receptory acetylcholinu: struktura, funkce a význam pro terapii v psychiatrii, online cit. 2013-04-24. Dostupné z:
http://www.tigis.cz/images/stories/psychiatrie/2003/01/07_2003_01.pdf
27. Fantasmidin, nový jedovatý alkaloid žáby *Epipedobates tricolor*, online cit. 2013-04-24. Dostupné z:
<http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=551>
28. Kurkumin – koření nebo nové léčivo Alzheimerovy nemoci?, online cit. 2013-04-25. Dostupné z:
<http://www.tigis.cz/images/stories/psychiatrie/2005/02/07patoc.pdf>
29. *Dictamnus albus* L.-třemdava bílá/jasenec bílý, online cit. 2013-04-27. Dostupné z:
<http://botany.cz/cs/dictamnus-albus/>.
30. Ivanova A., Kostova I., Mikhova B. a kol: Chemical components of *Dictamnus albus* L. *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite* 57, 45 – 48 (2004).
31. Woo W. S., Kang S. S.: Furoquinoline alkaloids in *Dictamnus albus* root bark. *Saengyak Hakhoechi* 16, 125 – 128 (1985); cit. podle *Chem. Abstr.* 104, 174458 (1986).
32. Kovalenko V. N.: Pharmacochemical and pharmacological properties of the alkaloid dictamnine from *Dictamnus albus* ssp. *turkestanicus*. *Farmacija (Moskva)* 9, 20 (1946).

33. Liou T. N., Chang Y. H.: *Dictamnus dasycarpus* Turczaninow. Bull. Soc. Imp. Natural. Moscou 15, 637 (1842); online cit. 2013-04-25: Flora of China, vol. 11, http://www.efloras.org/volume_page.aspx?volume_id=2011&flora_id=2
34. Zhao W. M., Wolfender J. L., Hostettmann K.: *Advances in Plant Glycosides, Chemistry and Biology*. Elsevier, Amsterdam 1999.
35. Du Ch., Yang X., Tu P.: Studies on chemical constituents in bark of *Dictamnus dasycarpus*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 30, 1663 – 1666 (2005); cit. podle Chem. Abstr. 147, 318318 (2006).
36. Jeong G. S., Byun, E., Li B. a kol.: Neuroprotective effects of constituents of the root bark of *Dictamnus dasycarpus* in mouse hippocampal cells. *Arch. Pharmacol Res.* 33, 1269 – 1275 (2010).
37. Lu Y., Ma W., Hu R. a kol.: Rapid and preparative separation of traditional Chinese medicine *Evodia rutaecarpa* employing elution-extrusion and back-extrusion counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1216, 4140 – 4146 (2009).
38. Kobayashi Y., Nakano Y., Kizaki M. a kol.: Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist. *Planta Med.* 67, 628 – 633 (2001).
39. Hu C. Q., Li F., Yang X. W.: Simultaneous determination and pharmacokinetic analysis of seven alkaloids and two flavonoids from rat plasma by HPLC-DAD after oral administration of Wuzhuyu decoction. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 14, 370 – 381 (2012).
40. Zhou Y., Li S. H., Jiang R. W. a kol.: Quantitative analyses of indoloquinazoline alkaloids in *Fructus Evodiae* by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20, 3111 – 3118 (2006).
41. Jayakumar T., Sheu J. R.: Cardiovascular pharmacological actions of rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J. Expl Clin. Med.* 3, 63 – 69 (2011).
42. Lee S. H., Son J. K., Jeong B.S. a kol.: Progress in the studies on rutaecarpine. *Molecules* 13, 272 – 300 (2008).
43. Rasul A., Yu B., Zhong L. a kol.: Cytotoxic effect of evodiamine in SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells via simultaneous induction of apoptosis and autophagy. *Oncolog. Rep.* 27, 1481 – 1487 (2012).

44. Yuan S. M., Gao K., Wang D. M. a kol.: Evodiamine improves cognitive abilities in SAMP8 and APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 295 – 302 (2011).
45. Smith N. a kol.: *Flowering Plants of the Neotropics*, Princeton Univ. Press (2003).
46. Itoh A., Saitoh T., Tani K. a kol.: Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Nelumbo nucifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 947 – 951 (2011).
47. Chen Y., Fan G., Wu H., Mitchell A.: Separation, identification and rapid determination of liensine, isoliensinine and neferine from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn. by liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry. *Journal Pharm. Biomed. Anal.* 43, 99 – 104 (2007).
48. Yang Z. D., Zhang X., Du J. a kol.: An aporphine alkaloid from *Nelumbo nucifera* as an acetylcholinesterase inhibitor and the primary investigation for structure-activity correlations. *Nat. Prod. Res.* 26, 387 – 392 (2012).
49. Jung H. A., Jin S. E., Choi R. J. a kol.: Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1. *Life Sci.* 87, 420 – 430 (2010).
50. *Phellodendron chinense*, korkovník čínský, online cit. 2013-05-11. Dostupné z: <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=4&id=46>
51. Zhu S. L., Dou S. S., Liu X. R. a kol.: Qualitative and quantitative analysis of alkaloids in Cortex *Phellodendri* by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. *Chem. Res. Chin. Univ.* 27, 38 – 44 (2011).
52. Hyun M. S., Woo W. H., Hur J. M. a kol.: The role of ROS and p38 MAP kinase in berberine-induced apoptosis on human hepatoma HepG2 cells. *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji* 51, 129 – 135 (2008); cit. podle *Chem. Abstr.* 149, 505680 (2008).
53. Xian Y. F., Lin Z. X., Ip S. P. a kol.: Comparison the neuroprotective effect of Cortex *Phellodendri chinensis* and Cortex *Phellodendri amurensis* against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Phytomedicine* 20, 187 – 193 (2013).
54. Wilbur C. K.: *Revolutionary Medicine 1700-1800*. Globe Pequot Press (1980).
55. *Zanthoxylum bungeanum* Maximowicz, online cit. 2013-06-25, dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200012477
56. Adesina S. K.: The Nigerian *Zanthoxylum*; Chemical and biological values. *Afr. J. Trad. Med.* 2, 285 – 288 (2005).

57. Ren L., Xie F.: Alkaloids from the root of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Yaoxue Xuebao* 16, 672 – 677 (1981); cit. podle Chem. Abstr. 96, 48974 (1982).
58. Fu T. T., Wu J. Y., Wang L. a kol.: Study on the Chinese herbal formula for treatment of vaginitis and the antimicrobial activity in murine models. *Journal of Chin. Med. Mater.* 29, 931 – 936 (2006).
59. Bhattacharya S., Kamaruz Zaman M., Ghosh K. A.: Histological and physico-chemical evaluation of *Zanthoxylum nitidum* stem bark. *Ethnobot. Leaflets* 13, 540 – 547 (2009).
60. *Zanthoxylum nitidum* (Roxburgh) Candolle, online cit. 2013-07-17, dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200012482.
61. Huang Q., Lei P., Ouyang D.: Progress on anti-tumor effect of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Zhongliu Yaoxue* 1, 482 – 485 (2011); cit. podle Chem. Abstr. 158, 377922 (2012).
62. Xang Z. D., Zhang D. B., Ren J., Yang M. J.: Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Med. Chem. Res.* 21, 722 – 725 (2012).
63. Yang G., Chen D.: Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chem. & Biodiv.* 5, 1718 – 1722 (2008).
64. Keil B.: *Laboratorní technika organické chemie*. Akademie věd Československé republiky, Praha 1963.
65. Opletal L.: osobní sdělení.
66. Steck T. L., Kant J. A.: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 31, 172 (1974).
67. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Feather-Stone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).
68. Blaschek, W. a kol. (ed.): *HagerROM 2011*. Springer und Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Heidelberg 2011.
69. Novák, Z., Hošťálková, A., Opletal, L., Nováková, L., Hrabínová, M., Kuneš, J., Cahlíková, L.: *Berberis vulgaris* and their Biological Activity. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1695 – 1697 (2015).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát **Mgr. Jana Hovorková**

Konzultant **prof. RNDr. Lubomír Opletal CSc.**

Název rigorózní práce **Přírodní látky a jejich biologická aktivita VII. Screening vybraných alkaloidních druhů rostlin na cholinesterasovou aktivitu.**

V rámci systematického studia rostlin, jejichž sekundární metabolity inhibují lidskou erytrocytární AChE a sérovou BuChE byly sledovány sumární ethanolové extrakty (S) a alkaloidní ethyl-acetátové extrakty (B) některých rostlinných druhů z čeledí Rutaceae (*Dictamnus albus*, kořen; *Dictamnus dasycarpus*, kůra kořene; *Evodia rutaecarpa*, plod; *Phellodendron chinense*, kůra; *Zanthoxylum bungeanum*, oplodí; *Zanthoxylum nitidum*, dřevo) a Nelumbonaceae (*Nelumbo nucifera*, embryo, semena, list, stamen) za použití Ellmanovy metody. V případě extraktů typu S byla nejvyšší inhibiční aktivita ($\mu\text{g/ml}$) nalezena u *Evodia rutaecarpa* (AChE $90,2 \pm 11,1$; BuChE $5,2 \pm 0,6$) a *Phellodendron chinense* (AChE $2,2 \pm 0,2$; BuChE $59,7 \pm 6,4$). U alkaloidních extraktů typu B inhibovaly enzymy nejvíce látky z *Evodia rutaecarpa* (AChE $9,8 \pm 0,9$; BuChE $9,7 \pm 0,9$) a z některých morfologických částí *Nelumbo nucifera*: embryí (AChE $45,9 \pm 4,1$; BuChE $11,6 \pm 1,1$) a listů (AChE $59,2 \pm 6,0$; BuChE $24,1 \pm 2,5$). Na základě znalostí o obsahových látkách ve všech uvedených rostlinách a jejich dřívějšímu studiu inhibice AChE a BuChE lze konstatovat, že pro další studium jsou vhodná embrya a listy *Nelumbo nucifera* zejména z hlediska inhibice BuChE.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, inhibice, Rutaceae, Nelumbonaceae, Ellmanova metoda.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate **Mgr. Jana Hovorková**

Consultant **Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

Title of Thesis **Natural compounds and their biological activity VII. Screening of selected alkaloidal plant species for cholinesterase activity.**

Within the systematic studies of plants producing metabolites that inhibit human erythrocytal AChE and serum BuChE, summary ethanolic extracts (S) and alkaloidal ethyl acetate extracts (B) of some plant species from the families Rutaceae (*Dictamnus albus*, root; *Dictamnus dasycarpus*, root bark; *Evodia rutaecarpa*, fruit; *Phellodendron chinense*, bark; *Zanthoxylum bungeanum*, pericarp; *Zanthoxylum nitidum*, wood) and Nelumbonaceae (*Nelumbo nucifera*, embryo, seeds, leaves, stamen) were studied using Ellman's method. Among extracts of S-type, the highest inhibitory activity ($\mu\text{g/ml}$) was found in *Evodia rutaecarpa* (AChE 90.2 ± 11.1 ; BuChE 5.2 ± 0.6) and *Phellodendron chinense* (AChE 2.2 ± 0.2 ; BuChE 59.7 ± 6.4). In alkaloidal extracts of B-type, the enzymes were inhibited most by the compounds of *Evodia rutaecarpa* (AChE 9.8 ± 0.9 ; BuChE 9.7 ± 0.9) and of some morphological parts of *Nelumbo nucifera*: germs (AChE 45.9 ± 4.1 ; BuChE 11.6 ± 1.1) and leaves (AChE 59.2 ± 6.0 ; BuChE 24.1 ± 2.5). Based on the knowledge about the constituents in all mentioned plants and on the former studies concerning AChE and BuChE inhibition by them, it can be stated that germs and leaves of *Nelumbo nucifera* are suitable for further studies, especially from the point of view of BuChE inhibition.

Key words: acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inhibition, Rutaceae, Nelumbonaceae, Ellman's method.