UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

ALKALOIDY LISTŮ DRUHU *LIRIODENDRON TULIPIFERA* L. A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA II

Bc. Kateřina Matoušová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala především své vedoucí diplomové práce paní PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za ochotu, přátelský přístup, trpělivost a shovívavost při tvorbě této práce. Také bych ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za přípravu alkaloidního extraktu, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter, Mgr. Ivaně Lakatošové za zpracování alkaloidního extraktu pomocí Flash chromatografie a celému kolektivu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině a přátelům za podporu v celém průběhu mého studia.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2023 Kateřina Matoušová

OBSAH

1. ÚVOD 11
2. CÍL PRÁCE 12
3. TEORETICKÁ ČÁST 13
3.1 Liliovník tulipánokvětý 13
3.1.1 Taxonomická klasifikace [3] 14
3.1.2 Morfologický popis 14
3.1.3 Fylogenetický vývoj 14
3.1.4 Biologická aktivita obsahových látek 15
3.1.5 Alkaloidy obsažené v listech 17
3.1.6 Biologická aktivita alkaloidů izolovaných z listů 20
3.2 Alzheimerova choroba 26
3.2.1 Etiologie 27
3.2.2 Patogeneze 27
3.2.3 Farmakoterapie 28
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 32
4.1 Materiál a přístrojové vybavení 32
4.1.1 Rozpouštědla 32
4.1.2 Chemikálie 32
4.1.3 Přístroje 33
4.1.4 Absorbenty pro chromatografii 34
4.1.5 Vyvíjecí soustavy pro TLC 34
4.1.6 Detekční činidla 35
4.1.7 Pomocný materiál 35
4.1.8 Pufry 35
4.1.9 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE 35
4.2 Metody 36

4.2.1 Obecné postupy 36
4.2.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností 37
4.2.3 Stanovení biologické aktivity 39
4.3 Izolace alkaloidů z listů *Liriodendron tulipifera* 41
4.3.1 Příprava alkaloidního extraktu 41
4.3.2 Čištění chloroformového extraktu a příprava alkaloidního Et_2O extraktu 42
4.3.3 Flash chromatografie přečištěného alkaloidního extraktu 43
4.3.4 Izolace alkaloidů z frakce č. 81–89 45
4.3.5 Izolace alkaloidů z frakce č. 68–80 46
5. VÝSLEDKY 47
5.1 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných alkaloidů 47
5.1.1 LL81C: Glaziovin 47
5.1.2 LL81A: Derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem 48
5.2 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči AChE, BuChE 49
6. DISKUSE 50
7. POUŽITÁ LITERATURA 52

ABSTRAKT

Matoušová K.: Alkaloidy listů druhu *Liriodendron tulipifera* L. a jejich biologická aktivita II. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2023.

Klíčová slova: *Liriodendron tulipifera*, alkaloidy, biologická aktivita.

U alkaloidů izolovaných z listů druhu *Liriodendron tulipifera* L. byla popsána rozmanitá biologická aktivita. Pro léčbu Alzheimerovy choroby (AD) je významná především jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase, tedy enzymům podílejících se na patogenezi AD. Látky ovlivňující tyto enzymy v současnosti představují hlavní dostupný přístup k léčbě AD, screening rostlinných drog proto zůstává aktuálním tématem.

Alkaloidní extrakt z listů *Liriodendron tulipifera* byl zvolen k izolaci alkaloidů a k jejich dalšímu zkoumání z důvodu pozitivních výsledků předběžných testů na jeho inhibiční cholinesterasovou aktivitu.

Zvolenou metodou pro separaci extraktu byla flash chromatografie. K izolaci alkaloidů ze zvolených frakcí (č. 81–89 a č. 68–80) byla využita preparativní tenkovrstvá chromatografie. U izolovaných látek byla vyhodnocena strukturní analýza (pomocí NMR a MS) a byla měřena jejich optická otáčivost. Hodnoty inhibiční aktivity vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase byly získány pomocí modifikované Ellmanovy metody a výsledky byly porovnány s literaturou.

Byl izolován proaporfinový alkaloid glaziovin a derivát proaporfinového alkaloidu stefarinu se seskviterpenoidem lanuginolid epoxidem. Izolace derivátu stefarinu se lanuginolid epoxidem není v současné literatuře popsána. Zatímco glaziovin významný potenciál vůči lidským cholinesterasam nevykazuje, derivát stefarinu se lanuginolid epoxidem by slibný potenciál mít mohl, což naznačují dobré inhibiční účinky stefarinu a seskviterpenoidů popsané v literatuře.

ABSTRACT

Matoušová K.: Alkaloids of leaves of species *Liriodendron tulipifera* L. and their biological activity II. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2023.

Key words: *Liriodendron tulipifera*, alkaloids, biological activity.

Alkaloids isolated from the leaves of *Liriodendron tulipifera* L. have been described to have a various biological activity. For Alzheimer's disease (AD) treatment is significant primarily the alkaloid's inhibitory activity towards enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, which contribute to the pathogenesis of AD. Substances affecting these enzymes represent the main accessible approach to AD treatment, therefore plant-based drug screening remains a relevant topic.

An alkaloid extract from the leaves of *Liriodendron tulipifera* was chosen for an isolation and identification of alkaloids due to the positive results of preliminary tests on its cholinesterase inhibitory activity.

The extract was separated by using a flash chromatography. The isolation of alkaloids from selected fractions (no. 81–89 and no. 68–89) was done by the use of preparative thin-layer chromatography. The structural analysis (implemented by NMR and MS) of isolated substances was determined and the optical rotation was measured. Modified form of Ellman's method identified inhibitory activity values for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, which were then compared with literature.

The proaporphine alkaloid glaziovine and derivative of proaporphine alkaloid stepharine with sesquiterpenoid lanuginolid epoxide were isolated. Isolation of stepharine from *Liriodendron tulipifiera* has not been mentioned in current literature. Derivate of stepharine with lanuginolid epoxide might have promising potential of inhibitory activity towards human cholinesterases, while glaziovine does not show any significant potential.

POUŽITÉ ZKRATKY

Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitory acetylcholinesterasy
AD	Alzheimer's disease = Alzheimerova choroba
APP	amyloidový prekurzorový protein
Aβ	amyloid β protein
BACE1	β-sekretasa 1, enzym štěpící β-amyloidní prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
COX-2	cyklooxygenasa 2. formy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	U. S. Food & Drug Administration = americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FOXO1	forkhead box protein O1
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
ChEI	inhibitory cholinesteras
IC_{50}	inhibiční koncentrace
IL	interleukin
LMTM	methylenová modř
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
PPARG	peroxisomovým proliferátorem aktivovaný γ-receptor
PSEN1/2	geny kódující vznik proteinu presenilin 1 nebo 2
RF	rizikový faktor
R_f	retenční faktor
sp.	species = druh

TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
UV	ultra violet = ultrafialové záření

PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 *Liriodendron tulipifera* L. [4] 13
Obrázek 2 Strukturní vzorce aporfinových alkaloidů listů *L. tulipifera* 18
Obrázek 3 Strukturní vzorce oxaporfinových alkaloidů listů *L. tulipifera* 18
Obrázek 4 Strukturní vzorec tetrahydroprotoberinového alkaloidu listů *L. tulipifera* ... 19
Obrázek 5 Strukturní vzorec tetrahydroprotoberinového alkaloidu listů *L. tulipifera* ... 19
Obrázek 6 Strukturní vzorec aristolaktamového alkaloidu listů *L. tulipifera* 19
Obrázek 7 Porovnání fyziologického mozku (vlevo) a mozku v pokročilé fázi AD (vpravo) ... 26
Obrázek 8 Léčiva ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteras 28
Obrázek 9 Léčivo ze skupiny inhibitorů NMDA receptoru 30
Obrázek 10 Sumární alkaloidní chloroformový výtřepek *Liriodendron tulipifera*. 41
Obrázek 11 Přečištěný alkaloidní etherový výtřepek *Liriodendron tulipifera*. 43
Obrázek 12 Chromatogramy frakcí (č. 68–80, č. 81–89) získané pomocí flash chromatografie vyvíjecí směsí $C_6H_5CH_3$ + Et_2NH (95:5) 44
Obrázek 13 Chromatogramy frakcí (č. 68–80, č. 81–89) získané pomocí flash chromatografie vyvíjecí směsí C_6H_{12}+ $CHCl_3$ + MeOH (5:90:5) 44
Obrázek 14 Chromatogramy frakcí (č. 68–80, č. 81–89) získané pomocí flash chromatografie vyvíjecí směsí EtOAc + MeOH + NH_3 (100:8:3) 45
Obrázek 15 Glaziovin 47
Obrázek 16 Derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem 48

Tabulka 1 Alkaloidy izolované z listů liliovníku 25
Tabulka 2 Léčiva s kortikální inhibicí AChE v klinických dávkách 29
Tabulka 3 Biologická aktivita izolovaného alkaloidu 49

1. ÚVOD

Využití rostlin a jejich sekundárních metabolitů je hluboko zakotveno v lidské historii. V průběhu času se naše pochopení a využití těchto sloučenin stále rozvíjí. Hlavní funkcí sekundárních rostlinných metabolitů je jejich role v obraně rostliny proti herbivorům, patogenům a jiným rostlinným škůdcům, nicméně pro člověka hrají klíčovou roli jako léčiva, aromatika, barviva, pesticidy a jiné.

Systémy tradiční medicíny po celém světě využívají rostlinné extrakty už tisíce let a v mnoha případech se jimi inspiruje i moderní vědecký výzkum pro vývoj nových léčiv. Výjimkou tomu není ani u léčiv Alzheimerovy choroby (AD). I když bylo toto neurodegenerativní onemocnění poprvé popsáno až na začátku 20. století, využití různých druhů alkaloidů na zlepšení kognitivních funkcí se datuje mnohem dříve. V současnosti je stále zlepšení kognitivních funkcí (paměť, učení, vnímání) a zpomalení progrese onemocnění z farmaceutického hlediska to nejdůležitější, co můžeme pro pacienta s touto neléčitelnou chorobou udělat.

Hlavním dostupným přístupem v terapii AD je podpora zhoršující se cholinergní aktivity, která je esenciální pro udržení kognitivních funkcí. Proto jsou inhibitory enzymů cholinesteras považovány za základní farmaceutickou strategii při léčbě AD, především díky jejich inhibiční aktivitě vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase, čímž snižují odbourávání neurotransmiteru acetylcholinu a tím zvyšují cholinergní neurotransmisi [1].

Tento druh molekuly s inhibiční aktivitou lze nalézt v rostlinné říši, například galantamin, který je zástupcem léčiv AD právě ze skupiny inhibitorů cholinesteras, byl původně izolován ze sněženky podsněžníku (*Galanthus nivalis* L.). Hledání bioaktivních látek z rostlin vede také k objevování nových sloučenin, ze kterých lze vyvinout semisyntetická analoga, například fyzostigmin, patřící mezi indolové alkaloidy, byl izolován z *Physostigma venenosum* a jeho chemická molekulární báze poskytla templát pro vývoj rivastigminu, dalšího z moderních léčiv AD ze skupiny cholinesterasových inhibitorů [2].

Z hlediska obsahu bioaktivních alkaloidů s potenciálním využitím v terapii AD je mimo jiné významná čeleď Magnoliaceae. Zástupcem této čeledi je *Liriodendron tulipifera* L. a na alkaloidy obsažené v listech tohoto stromu byla zaměřena tato diplomová práce jako součást dlouhodobého screeningu rostlin a sledování aktivity alkaloidů, které obsahují.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- zpracování literární rešerše na alkaloidy z listů liliovníku tulipánokvětého a jejich biologickou aktivitu
- výběr vhodné frakce pro izolační práce
- výběr vhodných metod pro izolaci alkaloidů
- izolace alkaloidů z vybraných frakcí včetně jejich přečištění
- stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek
- vyhodnocení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Liliovník tulipánokvětý

Liliovník tulipánokvětý je opadavý širokolistý strom z čeledi šácholanovitých. Díky svému estetickému dojmu a velkým žlutozeleným květům je v České republice vysazován jako okrasný strom zejména v parcích a zahradách. Je schopen růst v různých klimatických podmínkách, původně ovšem pochází ze Severní Ameriky, kde je součástí lesních porostů po celém východním území Spojených států. V lesních porostech vyniká zejména na podzim a to díky svým neobvyklým lyrovitým sytě žlutě zbarveným listům. Jeho populace je stálá a není klasifikován jako ohrožený druh [3].

Obrázek 1 *Liriodendron tulipifera* L. [4]

3.1.1 Taxonomická klasifikace [5]

Třída: Magnoliopsida

Řád: Magnoliales

Čeleď: Magnoliaceae

Rod: *Liriodendron*

Druh: *Liriodendron tulipifera* L. – liliovník tulipánokvětý

3.1.2 Morfologický popis

L. tulipifera je listnatý strom dorůstající se výšky až 45 metrů. Typický je pro něj rovný, mohutný kmen, který pokrývá světle šedá, hluboce brázditá kůra. Koruna stromu je rozložitá nebo kuželovitá. Listy mají světle zelený odstín, jsou 10–15 cm dlouhé s řapíkem dlouhým 5–11 cm. Čepel listu je charakteristická 2 mělkými horními laloky a 2 postranními laloky v nejširší části, někdy je ovšem spíše hranatého vzhledu, na obou stranách lysá. Květy mají žlutozelenou barvu s oranžovými proužky, tvarem jsou podobné tulipánu. Květ je tvořen třemi kališními lístky a šesti vzpřímenými korunními lístky [6]. Plodem jsou křídlaté dvou semenné nažky dlouhé okolo 3 cm. Křídlo nažky je tuhé a má špičatý tvar. Tyto nažky utvářejí plodenství připomínající šištici, která se po dozrání rozpadá ještě na stromě [6].

3.1.3 Fylogenetický vývoj

Díky fosilním nálezům víme, že vývojová linie liliovníků zasahuje již do druhohor, poté se ve třetihorách rozdělila na dva odlišné druhy, tedy východoamerický *L. tulipifera* a druhý, východoasijský druh, *Liriodendron chinense*. Soubory molekulárních dat se shodují v době divergence těchto dvou druhů, a to v období před 10-16 miliony let [7]. *L. chinense* se vývojově rozvětvil do dvou skupin – východní a západní. Nicméně fenotypové pozorování a skutečnost, že *L. tulipifera* je geneticky blíže východní skupině *L. chinense*, poukazují na to, že rozdělení *L. chinense* na východní a západní skupinu mohlo proběhnout dříve než mezikontinentální diferenciace mezi *L. chinense* a *L. tulipifera*. Dále z analýz genetické diverzity vyplývá, že *L. chinense* má desetkrát vyšší genetickou diverzitu než *L. tulipifera*, což naznačuje, že oblasti zahrnující pohoří

ve východní Asii a povodí řeky Jang-c'-ťiang nabízely úspěšnější útočiště než horská údolí na východě Severní Ameriky během čtvrtohorní doby ledové [8].

3.1.4 Biologická aktivita obsahových látek

Velké množství sloučenin obsažených v různých rostlinných orgánech *L. tulipifera* je biologicky aktivní a má potenciální léčebné účinky, to nám naznačuje již jeho využití v etnomedicíně původních obyvatel Severní Ameriky. Tonikum z kůry používali jako stimulans proti nevolnosti nebo úplavici a kůra, zejména z kořenů rozdrcená na prach, byla užívána jako protizánětlivý prostředek při záchvatovitých horečkách [9]. Odvar z kůry také sloužil pro léčbu revmatu, dyspepsie, jako anthelmintikum, proti průjmům a dalším nemocem [10]. K léčbě pomocí přípravků vyrobených z *L. tulipifera* se také přistoupilo během Americké občanské války. Nedostatek léčiv používaných v konvenční medicíně podnítil konfederační lékaře k využití přípravků z liliovníku jako antiseptikum [11].

Toto historické využití *L. tulipifera* inspirovalo i některé novodobé vědecké studie, ve kterých je zkoumána právě biologická aktivita sloučenin obsažených v různých částech rostliny a z té vyhodnocovány biologické účinky potenciálně využitelné v medicíně. Antiseptické účinky byly ověřeny např. Dettweilerem a spol. ve studii, kde jejich extrakty z *L. tulipifera* inhibovaly tvorbu biofilmu u *S. aureus* [11]. Jako hlavní inhibitor růstu kmenů *S. aureus* citlivých na meticilin byl identifikován seskviterpenový lakton laurenobiolid [12]. Protizánětlivé účinky byly zjištěny u sloučenin izolovaných z kořene stromu. Park a spol. ve své studii izolovali 33 sloučenin, ze kterých 7 mělo inhibiční účinek na produkci oxidu dusnatého v makrofázích a u nově získaného alkamidu tulipiferamidu bylo zjištěno, že zapříčiňuje potlačení zánětlivých mediátorů včetně TNFα, COX-2, IL-1β a IL-6 [13].

Antiarytmické účinky byly objeveny u sloučeniny ze skupiny lignanů, liriodendrinu (Obrázek 2), jakožto silného supresoru $CaCl_2$-indukovaných arytmií [14]. Také byly zkoumány jeho léčivé účinky na gastritidu a peptický vřed, kdy bylo zjištěno, že zvyšuje hladinu prostaglandinu E_2 a pH žaludku, snižuje objem žaludeční šťávy a inhibuje kolonizaci žaludeční sliznice bakterií *Helicobacter pylori* [15]. U liriodendrinu byl sledován také hypoglykemický účinek [16] a díky svému příznivému

hepatoprotektivnímu vlivu na může sloužit jako prevence proti apoptóze hepatocytů při ischemicko-reperfúzním poškození jater [17].

Z kůry stromu byly izolované sloučeniny ze skupin lignanů, steroidů a další sloučeniny s benzenovým jádrem, u sedmnácti z těchto sloučenin zjistili potenciální antioxidační schopnosti. Také prokázali schopnost těchto sloučenin inhibovat aktivitu tyrosinasy a snižovat tak obsah melaninu v živočišných buňkách, proto by mohly být potenciálně využity při kosmetickém bělení pleti, v terapeutických aplikacích nebo v potravinářském průmyslu [18].

Dále byly odhaleny protirakovinné účinky sloučenin nacházejících se v listech [19] i v kůře stromu [20]. Tato chemopreventivní aktivita byla dokázána pro buňky melanomu lidské kůže. Mezi sloučeniny, u kterých byly tyto účinky detekovány se řadí například sloučenina ze skupiny seskviterpenových laktonů – epitulipinolid diepoxid [19].

Asi nejvýznamnější skupinou bioaktivních sloučenin izolovaných z liliovníku jsou alkaloidy, které jsou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách.

3.1.5 Alkaloidy obsažené v listech

Významnou skupinu sekundárních metabolitů nacházejících se v *L. tulipifera* jsou alkaloidy, tedy dusíkaté sloučeniny, typické svými biologickými účinky na lidský organismus. Pro liliovníky společně s dalšími rostlinami z čeledi Magnoliaceae je charakteristická přítomnost isochinolinových alkaloidů [21], které jsou biosynteticky odvozené od aminokyseliny tyrosinu.

Poprvé byla zjištěna přítomnost alkaloidů v listech *L. tulpifera* sovětským vědcem A. P. Orekhovem v roce 1935. Další výzkum následoval v 60. letech, kdy byly detekovány v kůře stromu a později v 70. letech byly objeveny ve všech rostlinných orgánech a to v různých vegetačních obdobích [22]. V listech byla zjištěno maximální množství alkaloidů na jaře v raném vegetačním období rostliny a minimální naopak na podzim, když listy zežloutnou [23].

Z listů *L. tulpifera* byly zatím izolovány alkaloidy aporfinového, oxoaporfinového, proaporfinového, tetrahydroprotoberinového a aristolaktamového typu. Mezi alkaloidy aporfinového typu jsou řazeny: anonain [22], aporein [23], glaucin [24], isolaurelin, kaaverin, lirinidin, lirinin-*N*-oxid, *N*-methyllaurotetanin [22], nornuciferin, norstefalagin [25], nuciferin [24], *O*-methyllirinin, remerin a remerin-*N*-oxid [22]. Oxoaporfinové alkaloidy izolované z listů jsou lanuginosin, liridin, liriodenin a lysikamin. Dále se podařilo izolovat alkaloid proaporfinového typu: *N*-methylkrotsparin = glaziovin, tetrahydroprotoberinového typu: isokorypalmin [22] a aristolaktamového typu: tulipin A [26].

Obrázek 2 Strukturní vzorce aporfinových alkaloidů listů *L. tulipifera*

Aporfinové alkaloidy

glaucin: R_1=CH_3, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=OCH_3, R_6=OCH_3

kaaverin: R_1=H, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=OH, R_5=H, R_6=H

lirinidin: R_1=CH_3, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=OH, R_5=H, R_6=H

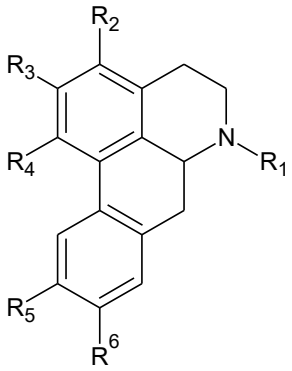
lirinin-*N*-oxid: R_1=O, CH_3, R_2=OH, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=H, R_6=H

***N*-methyllaurotetanin**: R_1=CH_3, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=OCH_3, R_6=OH

nornuciferin: R_1=H, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=H, R_6=H

nuciferin: R_1=H, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=H, R_6=H

***O*-methyllirinin**: R_1=CH_3, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=H, R_6=H



substituované methylendioxy- skupinou

anonain: R_1=H, R_2=H, R_3=H

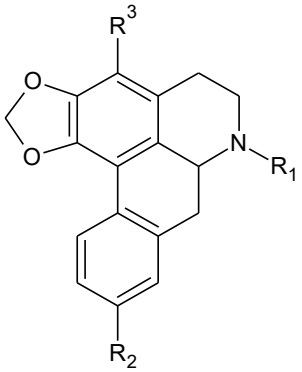
aporein: R_1=CH_3, R_2=H, R_3=H

isolaurelin: R_1=CH_3, R_2=OCH_3, R_3=H

norstefalagin: R_1=H, R_2=H, R_3=OCH_3

remerin: R_1=CH_3, R_2=H, R_3=H

remerin-*N*-oxid: R_1=O, CH_3, R_2=H, R_3=H

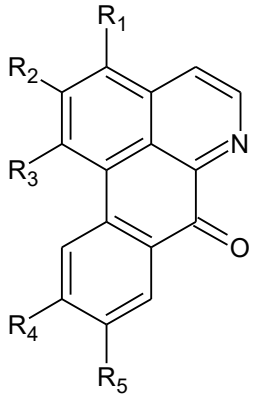


Obrázek 3 Strukturní vzorce oxaporfinových alkaloidů listů *L. tulipifera*

Oxaporfinové alkaloidy

liridin R_1=OCH_3, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=H, R_5=H

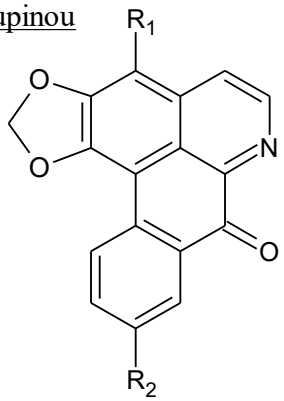
lysikamin R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=H, R_5=H



substituované methylendioxy- skupinou

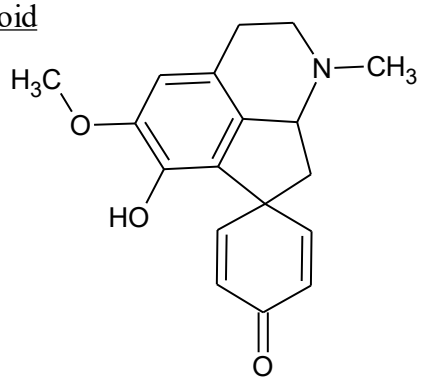
lanuginosin R_1=H, R_2=OCH_3

liriodenin R_1=H, R_2=H



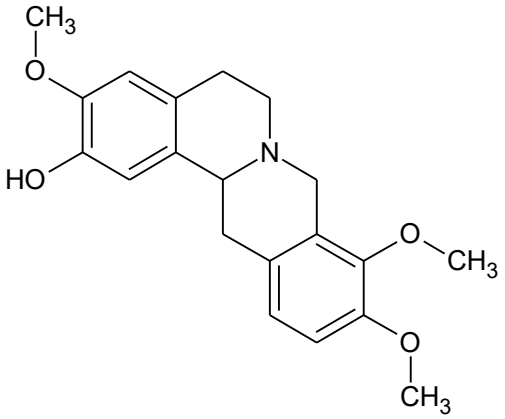
Obrázek 4 Strukturní vzorec tetrahydroprotoberinového alkaloidu listů *L. tulipifera*

Proaporfinový alkaloid
glaziovin



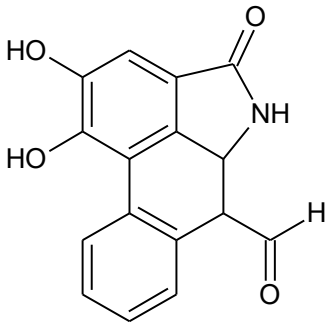
Obrázek 5 Strukturní vzorec tetrahydroprotoberinového alkaloidu listů *L. tulipifera*

Tetrahydroprotoberinový alkaloid
isokorypalmin



Obrázek 6 Strukturní vzorec aristolaktamového alkaloidu listů *L. tulipifera*

Aristolaktamový alkaloid
tulipin A



Z kůry a dřeva stromu byly navíc izolovány alkaloidy norglaucin, predicentrin, asimilobin [22], taliporfin [27], apoglaziovin = *N*-methylapokrotsparin [24], liriotulipiferin a lirioferin patřící do skupiny aporfinových alkaloidů. Z oxoaporfinových alkaloidů byl izolován aterospermidin, oxoxylopin [25], liriodendronin, korunnin [27] a *O*-methylaterolin. Alkaloid homomorfinanového typu pallidin [28] byl taktéž izolován z kůry stromu stejně jako další alkaloidy např. dehydroaporfinového typu: dehydroremerin, dehydroisolaurelin [22], dehydroglaucin, tetrahydroprotoberinového typu: stefolidin a další alkaloidy jako kadaverin [24].

Z kořene stromu byly izolovány aporfinové alkaloidy *N*-acetylnornuciferin, *N*-acetylanonain, *N*-acetyl-3-methoxynornuciferin a *N*-acetyl-3-methoxynornantenin [29].

3.1.6 Biologická aktivita alkaloidů izolovaných z listů

3.1.6.1 Alkaloidy aporfinového typu

Anonain je alkaloid s velice různorodou biologickou aktivitou zahrnující vasorelaxační, antibakteriální, antifungální, antioxidační, protirakovinné a antidepresivní účinky [30]. Má potenciál způsobit zástavu buněčného cyklu a poškození DNA, což brání fyziologickému chování rakovinných buněk [31]. Zmíněný potenciální vasorelaxační účinek je vysvětlili Valientem a spol. ve své studii, kde tuto schopnost ukázali na blokaci Ca^{2+} kanálu a inhibici aktivity α1-adrenoceptoru v hrudní aortě potkana [32]. Antidepresivní účinek anonainu je demonstrován schopností snižovat vychytávání dopaminu, což vede k proti úzkostným a uklidňujícím účinkům [33]. Byl u něj také zjištěn inhibiční účinek na AChE [34], hodnoty IC_{50} ale zatím popsány nebyly (Tabulka 1). Dále má anonain antiplasmodiální aktivitu, což vysvětluje historické použití *L. tulipifera* jako antimalarika [35]. Důkazem pro jeho antibakteriální a antifungální účinky jsou zjištěné silné inhibiční aktivity proti *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus, S. epidermidis* a antifungální aktivity proti růstu *Trichophyton rubrum* a *Microsporum gypseum*. Navíc jeden schválený americký patent uvádí, že anonain je také užitečný při prevenci a léčbě gastrointestinálních dyskinetických onemocnění [30].

K potenciální léčbě psychotických poruch a drogové závislosti by mohl být využit další aporfinový alkaloid aporein, který můžeme zařadit mezi antagonisty adrenergních

receptorů, díky jeho schopnosti inhibovat serotoninem či noradrenalinem indukovanou aktivaci těchto receptorů [36].

Glaucin je také velice významná bioaktivní sloučenina. Může inhibovat migraci a invazi lidských buněk rakoviny prsu a významně blokovat aktivitu a expresi matrixové metaloproteinasy-9, která hraje ústřední roli při invazi a metastázování různých typů rakovinných buněk [37]. Potenciálně lze také využít glaucin k léčbě astmatu. Má schopnost snižovat kontraktilní reakce a redukuje trvalý vzestup [Ca^{2+}] i produkovaného histaminem v buňkách hladkého svalstva dýchacích cest. Dále selektivně inhibuje fosfodiesterasu 4 pocházející z bronchů a polymorfonukleárních leukocytů a je antagonistou spontánního i histaminem indukovaného tonusu v lidském bronchu [38]. Dále má kardiovaskulární účinky (hypotenze, bradykardie) a vasorelaxační účinek projevující se schopností blokovat α1-adrenoceptor a inhibovat aktivitu Ca^{2+} kanálů [39].

Biologicky aktivní je i alkaloid isolaurelin. Má schopnost inaktivovat protein FOXO1 (forkhead box protein O1), jehož inhibice je jedním z cílů léčby diabetes mellitus [40]. Také má potenciál sloužit jako antagonista 5-hydroxytryptaminových a α1 adrenergních serotoninových receptorů, což lze využít při léčbě poruch centrálního nervového systému, drogové závislosti nebo předávkování [41]. Isolaurelin se dále řadí mezi sloučeniny, které mají schopnost účinkovat proti obezitě tím, že snižují expresi genu proteinu spojovaného s tukovou hmotou a obezitou [42]. Také je zajímavý pro svou vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE (Tabulka 1).

Kaaverin je potenciálně schopný regulovat klíčové dráhy v tkáních hypotalamu, včetně drah serotonergních a GABAergních synapsí, a mohl by tak být využit například pro léčbou nespavosti [43]. Jako u jiných aporfinových alkaloidů byl i u kaaverinu zjištěn anthelmintický a antiprotozoální účinek. Lin a spol. ve své studii [44] tuto schopnost ukázali na snížení spontánních pohybů či přímo usmrcením *Hymenolepis nana* vlivem kaaverinu a dalších sloučenin. Fournet a spol. ve své studii popsali antiprotozoální aktivitu proti parazitům *Leishmania* a *Trypanosoma cruzi* [45]. U kaaverinu byla také zjištěna silná antioxidační aktivita [46].

Lirinidin je jeden z alkaloidů, u kterého byly odhaleny protirakovinné účinky a to na buňkách melanomu lidské kůže [19]. Je také obsažen v souplodí lotosu, využívaného v bylinné medicíně k modulaci imunity. Tuto jeho silnou inhibiční aktivitu u potravinových alergií popsal Cao a spol. [47]. Lirinidin je schopen procházet přes

hematoencefalickou bariérou a vykazuje akcelerační účinky na růst neuritů v buňkách PC-12, což by mohlo být využito pro léčbu Alzheimerovy choroby [48]. Guan a spol. se ve své studii zaměřili na screening bioaktivních sloučenin, z nichž byla jedna lirinidin, zacílených na tumor nekrotizující faktor α (TNF-α), využívaných pro léčbu nealkoholické steatohepatitidy. Zjistili inhibiční účinek těchto sloučenin na TNF-α ve spojitosti se snížením hladin IL-6 a IL-1β [49].

Protizánětlivé schopnosti má sloučenina *N*-methyllaurotetanin. Jeho vlivem je inhibována tvorba superoxidových aniontů v lidských neutrofilech [50]. Dále je popsáno, že *N*-methyllaurotetanin vykazuje dobrou afinitu k 5-HT_1 a 5-HT_2 serotoninovým receptorům, které hrají důležitou roli u spousty neuropsychiatrických poruch a při drogových závislostech [51]. Hung a spol. také uvádí, že může mít potenciální využití jako léčivo na podporu kognitivních funkcí [52].

Nornuciferin je další ze skupiny alkaloidů s velice významnou biologickou aktivitou. Stejně jako u předchozích, zde již zmíněných alkaloidů, byly popsány jeho potenciální biologické účinky, například antioxidační [46], imunomodulační [47], anthelmintický [44], antidepresivní [33], proti nespavosti [43] a inhibiční účinek na TNF-α [49]. Velice zajímavý je jeho hypolipidemický účinek, je totiž schopen ovlivnit expresi genů, které jsou zodpovědné za sekreci žluči, metabolismu glycerolipidů, metabolismu sfingolipidů a dalších látek [53]. Také má potenciální uplatnění při léčbě infekcí způsobených *Candida albicans*, má schopnost působit na její plazmatickou membránu a integritu buněčné stěny s významným snížením životaschopnosti jejích buněk [54].

Biologicky aktivní je též alkaloid norstefalagin. Má protirakovinné účinky [19], Cortes a spol. ve své studii zjistili, že je potenciálním relaxantem hladkého svalstva, jelikož vykazuje relaxační aktivitu na děložní kontrakce potkana indukované KCl nebo oxytocinem v přítomnosti vápníku [55]. Norstefalagin má také potenciální antidepresivní účinek, jež je demonstrován jeho schopností inhibovat vychytávání dopaminu [56].

Nuciferin můžeme považovat za jeden z nejvýznamnějších bioaktivních alkaloidů této skupiny. Důkazem toho je například studie Khana a spol., ve které zkoumali účinky nuciferinu na potkanech s Diabetes mellitus. Nuciferin významně snížil hladinu glukosy v krvi a obnovil tělesnou hmotnost u těchto potkanů. Navíc obnovil hladiny antioxidačních enzymů, které se snížily během indukovaného diabetu, aktivita AChE byla významně obnovena v krvi i v mozku [57]. Nuciferin dále prokázal silné inhibiční účinky

proti α-glukosidase a α-amylase. Díky těmto výsledkům lze nuciferin považovat za potenciálně účinný fytomedicínský prostředek pro léčbu diabetu či Alzheimerovy choroby. Příznivě působí i proti oxidačnímu stresu. Nuciferin také zabraňuje úbytku kostní hmoty tím, že narušuje tvorbu vícejaderných osteoklastů a podporuje tvorbu cév typu H [58]. Také se tento alkaloid ukázal jako účinný inhibitor ferroptózy, díky tomu je schopen urychlit zotavení se z akutního poškození ledvin [59]. Dále je významný díky svým antioxidačním [46], anthelmintickým [44] a vasodilatačním účinkům [60], kardioprotektivnímu účinku proti infarktu myokardu [61] a inhibičnímu účinku na TNF-α [49].

U dalšího alkaloidu remerinu byla zjištěna antifungální aktivita, konkrétně schopnost inhibovat tvorbu biofilmu u *Candida albicans* [62], a také antioxidační [46], anthelmintická [44] a vasorelaxační [32] aktivita. Má potenciální antidepresivní účinky [63] a také byl popsán jako potenciální účinný lék proti rakovině prostaty, díky jeho schopnosti inhibovat proliferaci a migraci rakovinných buněk a indukovat jejich apoptózu v různých stupních [64].

3.1.6.2 Alkaloidy oxoaporfinového typu

Lanuginosin není tak biologicky významný jako další oxoaporfinové alkaloidy. Nicméně bylo u něj zjištěno, že vykazuje antivirovou aktivitu proti viru herpes simplex [65] a má potenciální imunostimulační účinek [66].

Liridin a lysikamin mají baktericidní účinek na gramnegativní β-laktamasu produkující rodem *Klebsiella* [67]. Lyskamin je také inhibičně aktivní proti *Staphylococcus epidermidis* a *Candida dubliniensis* [68]. Může ovlivnit metabolismustryptofanu tím, že je schopen inhibovat enzymy *N*-2,3-dioxygenasu a tryptofan-*N*-2,3-dioxygenasu [69]. Qin a spol ve své studii popisují, že vykazuje cytotoxicitu vůči buněčným liniím hepatokarcinomu. Jimi připravené komplexy lysikaminu a kovů jako Ru, Rh, Mn a Zn blokovaly buněčný cyklus rakovinných buněk v S fázi a indukovaly jejich apoptózu [70].

Za nejvýznamnější alkaloid liliovníku můžeme považovat liriodenin. Je pro něj charakteristické velké množství nejrůznějších biologických aktivit. Příkladem je jeho kardioprotektivní účinek demonstrovaný schopností blokovat Na^+ a K^+ kanály (antiarytmické působení), snížit uvolňování NO, schopností podporovat obnovu koronárního průtoku a snižovat tak pravděpodobnost vzniku infarktu myokardu [71].

Liriodenin je také známý svými protirakovinnými účinky. Jeho schopnost ovlivňovat buněčný růst a apoptózu lidských buněk rakoviny prsu prostřednictvím podpory exprese proteinu p53 je popsáno ve studii [72]. Dále může působit jako selektivní antagonista M_3 receptoru v hladkém svalstvu [73]. Společně s dalšími alkaloidy, které byly izolovány z listů *L. tulipifera,* jsou popsány jeho antidepresivní účinky [33], schopnost účinkovat proti obezitě [42], antioxidační aktivita [46], baktericidní účinek [67] a antimikrobiální vliv na *Staphylococcus epidermidis* a *Candida dubliniensis* [68], antiplasmodiální aktivita [35], antivirová aktivita proti viru herpes simplex [65] a také neméně známý imunostimulační účinek [66]. Také je aktivní vůči AChE a BuChE, hodnoty jeho inhibičních aktivit se však v různých studiích významně liší (Tabulka 1).

3.1.6.3 Alkaloidy proaporfinového a tetrahydroprotoberinového typu

Biologicky aktivním zástupcem alkaloidů poraporfinového typu je *N*-methylkrotsparin. Byl u něj prokázán antivirový účinek proti viru herpes simplex [74].

Isokorypalmin je bioaktivní sloučenina ze skupiny tetrahydroprotoberinových alkaloidů. Vykazuje komplexní aktivitu proti povrchové chronické gastritidě a to prostřednictvím jeho interakcí se sloučeninami, které jsou spojovány se symptomy gastritidy [75]. Dále L-isokorypalmin pravděpodobně působí jako parciální agonista D_1 receptorů a antagonista D_2 receptorů a může být slibným prostředkem pro léčbu závislosti na kokainu [76]. U isokorypalminu byly také objeveny potenciální biologické účinky využitelné při léčbě Alzheimerovy choroby, je totiž schopen inhibovat enzym BACE1 [77] a má inhibiční vliv na cholinesterasy (Tabulka 1).

Tabulka 1 Alkaloidy izolované z listů liliovníku s inhibiční aktivitou vůči cholinesterasám

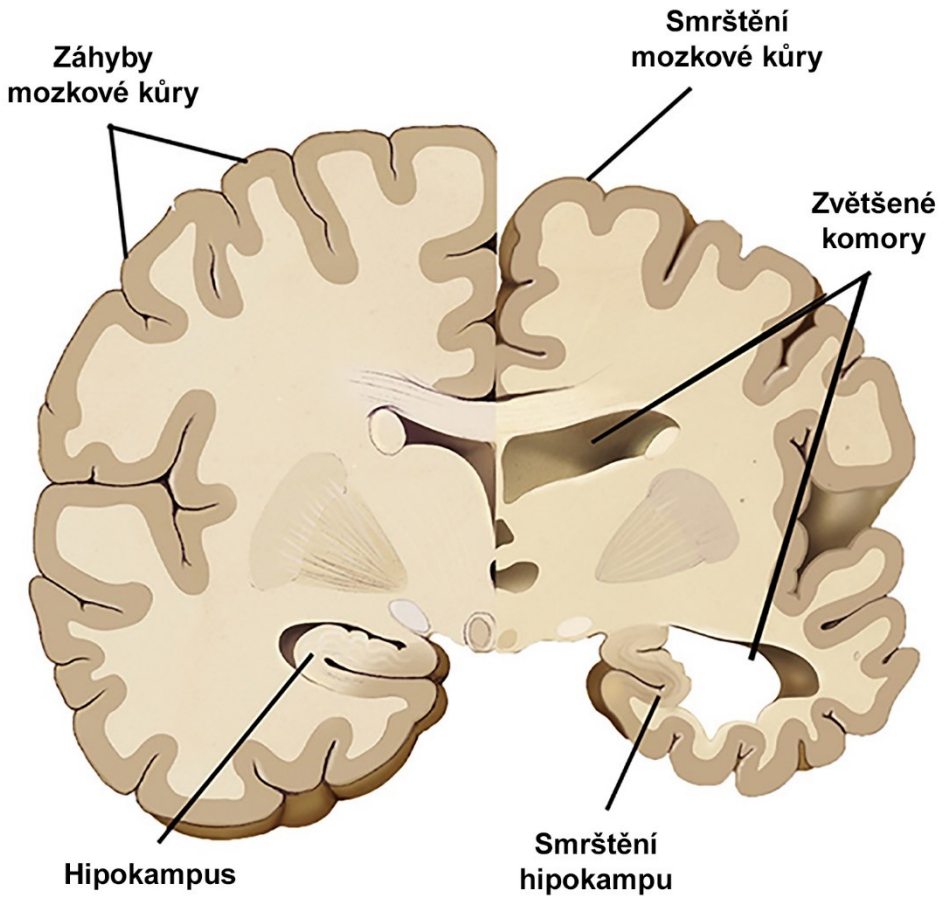
Alkaloid s inhibiční aktivitou	IC_{50} [μM]		Literatura
	AChE	BuChE	
anonain	-	-	[34]
glaucin	89,0 ± 0,8	-	[78]
	214 ± 2,6	>250	[79]
isokorypalmin	196,0 ± 4,2	> 1000	[80]
isolaurelin	8,36 ± 1,19	-	[81]
lanuginosin	42,5 ± 2,5	-	[82]
liriodenin	3,5 ± 1,0	3,2 ± 0,1	[79]
	9,7 ± 1,8	167,3 ± 45,6	[83]
lysikamin	16,1 ± 1,5	-	[84]
nornuciferin	-	5,6 ± 0,72	[85]
N-methyllaurotetanin	898,0 ± 10,5	> 1000	[80]
	-	218,81	[86]
remerin	20,7 ± 1,3	-	[82]

3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku, jehož hlavním znakem je postupná ztráta nervových buněk. Celosvětově je toto onemocnění popisováno jako nejčastější příčina demence, což znamená, že zapříčiňuje ztrátu kognitivních funkcí a behaviorálních schopností do takové míry, že zasahuje do každodenních činností života člověka. V současné době na tuto nemoc neexistuje účinná léčba, je možné pouze zmírňovat její příznaky a zpomalovat její průběh. Díky vysoké prevalenci této nemoci se AD řadí mezi deset nejčastějších příčin smrti celosvětově, v USA je ji přisuzována sedmá příčka [87].

AD lze klasifikovat podle toho v jakém věku se projeví první příznaky choroby. Raná forma AD se projevuje již před dosažením věku 65 let, zatímco pozdní forma, která představuje více než 95 % případů, má začátky prvních projevů po dosažení věku 65 let [88].

Obrázek 7 Porovnání fyziologického mozku (vlevo) a mozku v pokročilé fázi AD (vpravo)



3.2.1 Etiologie

V manifestaci AD hrají roli jak genetické, tak environmentální rizikové faktory (RF). Největším RF je již zmiňovaný věk. Výskyt AD ve věku do 65 let je méně častý, ale odhady naznačují, že tato věková skupina představuje přibližně 3 % případů AD. Ve věku 85 let se výskyt zvyšuje na více než 30 % [89].

Genetické predispozice jsou také důležitým faktorem, a to zejména u rané formy AD. Téměř všechny tyto případy totiž vykazují autozomálně dominantní dědičnost, konkrétně mutace genů APP, PSEN1 nebo PSEN2, zatímco velká většina případů pozdní formy AD je sporadická. Tyto případy pozdní formy jsou často výsledkem kombinace genetických a environmentálních RF, přičemž mezi nejčastější faktory patří mozková hypoperfuze [90] a zánět [91]. Díky moderním genetickým metodám jako sekvenování nové generace a celogenomové asociační studie je se vznikem pozdní formy spojováno stále více rizikových lokusů. V současnosti je popsáno více než 20 takových lokusů [92].

Dalším rizikovým faktorem pro rozvoj AD je Downův syndrom. Do věku 65 let se až u 80 % jedinců s Downovým syndromem rozvine demence [93]. Se zvýšeným rizikem vzniku AD jsou spojovány i kardiovaskulární onemocnění, včetně vysokého krevního tlaku či srdečního infarktu, a cerebrovaskulární onemocnění jako je ischemie [94]. Jako další RF jsou popsány environmentální vlivy např. znečištění ovzduší [95], expozice těžkým kovům [96] a stres [97].

3.2.2 Patogeneze

Patologie Alzheimerovy choroby je charakterizována ztrátami synapsí, degenerací cholinergních neuronů, tvorbou amyloidních plaků obsahujících amyloid-β peptid (Aβ) a neurofibrilárních klubek, které jsou složeny z hyperfosforylovaného τ-proteinu [98]. Přesný mechanismus patologie nemoci však doposud zůstává neobjasněn, a to i přes rozsáhlý výzkum a nespočet studií zabývající se rolí Aβ i τ-proteinu v rozvoji AD. Je pravděpodobné, že kombinace různých RF u různých pacientů aktivují onemocnění odlišnými způsoby a ty se pak sbíhají na společné cestě degenerace [99].

Časná a selektivní degenerace cholinergních neuronů je základním znakem Alzheimerovy choroby. Nejen degenerace neuronů je ovšem příčinou poškození cholinergní neurotransmise. Pro správný přenos nervového vzruchu jsou nezbytné

i enzymy acetylcholinesterasa (AChE) nebo butyrylcholinesterasa (BuChE), jejich účinkem se hydrolyzuje mediátor acetylcholin (ACh) na cholin a acetát, což vede k zastavení působení tohoto neurotransmiteru. Korelace závažnosti demence s narušením těchto cholinergních markerů (snížení syntézy a hladin ACh, AChE, acetylcholintransferasy, zvýšení hladin BuChE, pokles množství nikotinových acetylcholinových receptorů) naznačuje úzkou souvislost mezi ztrátou funkce cholinergního systému a kognitivním poklesem u AD a podporuje tak použití cholinergní terapie u tohoto onemocnění [100].

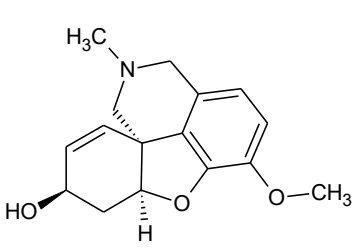
3.2.3 Farmakoterapie

Navzdory enormnímu úsilí farmaceutického průmyslu prozatím není k dispozici žádná účinná terapie AD. V současnosti existuje šest léčiv schválených americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) sloužících pro léčbu kognitivních a behaviorálních symptomů a zpomalení progrese nemoci [1]. V ČR jsou zatím povoleny čtyři.

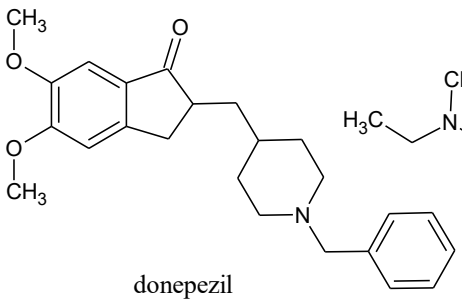
3.2.3.1 Inhibitory acetylcholinesterasy

Posílení cholinergní neurotransmise prostřednictvím acetylcholinesterasy AChEI v současné době představuje hlavní dostupný přístup k léčbě časných i pozdních fází AD [1]. Terapie pomocí AChEI u pacientů s AD prokázala obecně zlepšení schopnosti věnovat pozornost a získávání informací, které jsou na pozornosti závislé [101]. Dále se u pacientů projevilo zlepšení krátkodobé paměti [102] a pozitivní účinek na jazykovou dysfunkci [103].

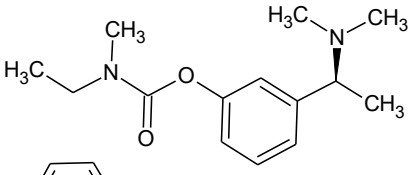
Obrázek 8 Léčiva ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteras



galantamin



donepezil



rivastigmin

V polovině 80. let byla zavedena první generace AChEI, reprezentovaná fysostigminem [104], poté byla v polovině 90. let vyvinuta druhá generace vhodnějších sloučenin, včetně prvního léku používaného při léčbě AD tetrahydroaminoakridinu (takrinu) [105]. Ten byl později stažen díky jeho nežádoucím gastrointestinálním (GIT) a hepatotoxickým účinkům. V současnosti jsou schválené tři léky na cholinergní bázi a to galantamin, donepezil a rivastigmin. Jsou to sloučeniny, které jsou klinicky účinnější a v léčebných dávkách mají méně závažné vedlejší účinky soustředěné převážně na GIT soustavu [1]. Klinické studie zabývající se jejich dávkováním, délkou léčby a účinky na AChE jsou shrnuty v Tabulka 1Tabulka 2.

Tabulka 2 Léčiva s kortikální inhibicí AChE v klinických dávkách

Lék	Dávka [mg]	Délka léčby	Kortikální inhibice AChE [%]	Zdroj
Galantamin	16–24	12 měsíců	30–40	[106]
Donepezil	5	12 týdnů	19–24	[107]
Donepezil	3–5	5 týdnů	27	[108]
Donepezil	10	3 měsíce	29–39	[109]
Rivastigmin	9	3–5 měsíců	29–37	[109]

ChEI terapie Alzheimerovy choroby je obecně považována za krátkodobou intervenci se symptomatickými účinky trvajícími maximálně 3–6 měsíců. Nicméně otevřené a randomizované placebem kontrolované studie trvající 24 měsíců nebo déle naznačují, že stabilizace onemocnění a udržení klinických účinků po dobu delší než 12 měsíců je u mnoha pacientů proveditelným cílem [110].

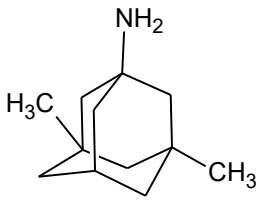
3.2.3.2 Inhibitory N-Methyl-D-Aspartátových receptorů

Do této skupiny léčiv AD je řazen jediný schválený zástupce – memantin. Memantin je nekompetitivní modulátor NMDA receptoru, jehož působením se potlačuje neurotoxicita zprostředkovaná glutamátem, která vzniká při odumírání neuronů během progrese AD, nicméně přesný mechanismus jeho účinku není zcela objasněn [111]. Metaanalýza zabývající se daty z více nezávislých studií potvrzuje pozitivní účinek tohoto léčiva u středně těžké až těžké AD na kognitivní funkce a neuropsychiatrické symptomy [112].

Stejně jako u ChEI je však jeho účinek poměrně nízký a jeho medikace nemá skoro žádný vliv na dlouhodobou progresi onemocnění. Navíc se díky jeho marginálním účinkům u mírného až středně těžkého stádia onemocnění nedoporučuje předepisovat tento lék

pacientům v časných stádiích AD [113]. Pro rozšíření jeho účinků se memantin také vyrábí přímo v kombinaci s donepezilem. Toto schválené léčivo blokuje toxické účinky spojené s přebytkem glutamátu a zároveň zabraňuje rozkladu acetylcholinu v mozku [114].

Obrázek 9 Léčivo ze skupiny inhibitorů NMDA receptoru



memantin

3.2.3.3 Monoklonální protilátky proti Aβ

Poslední dvě FDA schválená léčiva se využívají při pasivní imunoterapii jako monoklonální protilátky proti Aβ. Jedná se o aducanumab a lecanemab. Využívají se k léčbě mírné kognitivní poruchy nebo časného stádia AD odstraněním abnormálního Aβ, čímž napomáhají snížit počet amyloidních plaků [114].

3.2.3.4 Další nadějná léčiva ve vývoji

V centru pozornosti jsou skupiny látek zaměřeny především na ovlivnění amyloidní kaskády, neuroprotektiva a antipsychotika. Ve 3 fázi vývoje jsou nadějná léčiva s účinkem na Aβ jako např. další lidské monoklonální protilátky gantenerumab a donanemab [115] nebo proléčivo tramiprosát ALZ-801, které je po podání pomocí endogenních enzymů přeměněno na homotaurin. Ten působí jako ligand stabilizující $A\beta_{42}$ monomery a zároveň potlačuje jeho formování do oligomeru a elongaci [116].

Léčiva, jejichž účinek působí proti τ-proteinu mají zpoždění v řádu několika let oproti přípravkům zaměřeným proti β-amyloidu. V současnosti je jediným kandidátním lékem ve 3. fázi testování methylenová modř (LMTM) [115]. Účinkem LMTM se snižuje agregace nesprávně složeného τ-proteinu a rozpadají se již existující neurofibrilární klubka [117].

Jako nadějné neuroprotektivum je testován lék pioglitazon u pacientů v počátečních stádiích AD. Pioglitazon je schválený pro léčbu diabetu 2. typu a patrně ovlivňuje metabolismus glukosy v mozku, degradaci neuronů, tvorbu τ-proteinu a Aβ, zánět, průtok krve mozkem a také zlepšuje učení a paměť [118].

Poslední skupinou léčiv jsou antipsychotika. Zaměřují se na léčbu projevů doprovázejících AD, jako jsou např. psychózy, agitovanost, halucinace a bludy. Jejich výzkum je ovšem velikou výzvou, u spousty těchto léčiv je využití při léčbě AD kontroverzní – související s rizikem zhoršení příznaků této nemoci [115].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Rozpouštědla

- aceton p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Me_2CO)
- benzin lékařský RN vyhovující ČL 2009 a ČSN 65 6544 (Ing. Švec – Penta, Praha) (benzin)
- chloroform deuterovaný pro NMR analýzu chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) ($CDCl_3$)
- cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- dichlormethan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2Cl_2)
- ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- ethylester kyseliny octové = ethyl acetát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- chloroform (Ing. Švec – Penta, Praha) ($CHCl_3$)
- methanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- methanol deuterovaný pro NMR analýzu methanol-d4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)
- toluen č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($C_6H_5CH_3$)
- voda superčistá (H_2O)

4.1.2 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- amoniak vodný roztok 25–29% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)
- dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH_2PO_4)

- dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$)
- diethylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2NH)
- dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (DMSO)
- 5,5´-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)
- hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (ing. Švec – Penta, Praha) (NaH_2PO_4)
- chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- kyselina trifluoroctová (Sigma Aldrich, Praha) (TFAA)
- uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)

4.1.3 Přístroje

- knihovna spekter NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)
- microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- odstředivka Avanti J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- program ACD/ChemSketch (Freeware) 2022.2.2 (ACD/Labs, Toronto, Ontario, Canada)
- program GraphPad Prism verze pro Windows (Graph PaD Software, SanDiego, California, USA)
- reader Synergy TM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- spektrometr EI/MS na GC-MS system using an Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 × 025 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

- spektrometr ESI/MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Arcade, New York, USA)
- spektrometr VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany)

4.1.4 Absorbenty pro chromatografii

- Analytické TLC desky Silica gel 60 GF254 for TLC (Merck Millipore, Praha). Pro kontrolní účely cm se používány desky 20 × 20 cm a stříhány na výšku 10 cm a šířku zvolenou dle počtu analyzovaných sloučenin. Pro preparativní TLC byly desky stříhány na rozměry 20 × 10 cm nebo 10 × 10 cm podle množství analyzovaných sloučenin.
- Preparativní lité TLC desky o rozměrech 15 × 15 cm byly připraveny ze silikagelu Silicagel 60 GF254 (Merck Millipore, Praha).

4.1.5 Vyvíjecí soustavy pro TLC

S1: $C_6H_5CH_3$ + Et_2NH (95 : 5)

S2: C_6H_{12} + $CHCl_3$ + MeOH (5 : 90 : 5)

S3: C_6H_{12} + $CHCl_3$ + H_2O (5 : 90 : 5)

S4: C_6H_{12} + CH_2Cl_2 + MeOH (5 : 90 : 5)

S5: $C_6H_5CH_3$ + Me_2CO + EtOH + NH_4OH (40 : 40 : 6 : 2)

S6: C_6H_{12} + $C_6H_5CH_3$ + Et_2NH (45 : 5 : 50)

S7: MeOH + H_2O + TFAA (40 : 10 : 0,2)

4.1.6 Detekční činidla

- Dragendorffovo činidlo bylo připraveno smícháním 5 ml předem připraveného zásobního roztoku s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Zásobní roztok byl předem připraven ze dvou roztoků (A, B) v poměru 1:1 (roztok A: 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody; roztok B: 32 g KI v 80 ml vody). Roztok byl uchováván v lednici při 4 °C.

4.1.7 Pomocný materiál

- přečištěná vata
- křemelina (Sigma Aldrich, Praha)
- vliselin

4.1.8 Pufry

- 5mM fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven z 57 ml roztoku A, 283 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A: 10mM roztok NaH_2PO_4, tedy v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH_2PO_4 a zásobní roztok B: 10mM roztok Na_2HPO_4, kde je v jednom litru roztoku obsaženo 1,42 g NaH_2PO_4.
- 5mM fosfátový pufr o pH 7,4 s obsahem 150 mM chloridu sodného byl připraven z 8,766 g NaCl p.a. rozpuštěného v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a jím doplněn na objem 1000 ml.

4.1.9 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

- Roztok 5mM DTNB byl připraven rozpuštěním DTNB v 100mM fosfátovém pufru pH 7,4. Připravený slabě nažloutlý roztok byl uchováván v lednici při 4 °C po dobu maximálně 1 týdnu.
- Roztok 10mM ATChI byl připraven rozpuštěním látky ve vodě. Připravený čirý roztok byl uchováván v lednici při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.
- Roztok 10mM BuTChI byl připraven stejným způsobem jako roztok ATChI a uchováván v lednici při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

4.2 Metody

4.2.1 Obecné postupy

4.2.1.1 Příprava rozpouštědel

Před použitím byla rozpouštědla destilací přečištěna a dále byla uchovávána v nádobách z tmavého skla (ochrana před světlem).

4.2.1.2 Odpařování

Eluáty získané při preparativní TLC byly odpařovány na vakuové odparce Laborota 4000 Heidolph na vodní lázni při 40 °C.

4.2.1.3 Skladování

Alkaloidní extrakty, frakce v různých fázích zpracování i chemicky čisté látky byly skladovány v lednici při teplotě 2–8 °C.

4.2.1.4 Příprava desek pro preparativní TLC

Na vyčištěné skleněné desky o rozměru 15 × 15 cm byla nalita předem připravená suspenze silikagelu. Na jednu desku bylo použito 6,5 g silikagelu (Silicagel 60 GF254) dispergovaného v 20 ml vody. Suspenze byla na skleněnou desku nalévána rovnoměrně s docílením hladkého a jednotného pokrytí povrchu. Desky byly následně ponechány uschnout při pokojové teplotě po dobu alespoň jednoho dne.

4.2.1.5 Preparativní TLC

Směs alkaloidů byla nanášena na pomyslnou linii 1 cm od spodního okraje (start) na připravené skleněné nebo komerční hliníkové desky po rozpuštění v menším objemu roztoku $CHCl_3$ a EtOH. Dělená směs byla nanášena tak, aby její množství nepřesahovalo 1 $mg \cdot cm^{-1}$ u komerčních desek a 3 $mg \cdot cm^{-1}$ u laboratorně připravených skleněných desek. Po nanesení směsi alkaloidů a odpaření rozpouštědel byly desky vyvíjeny v komorách nasycených zvolenou mobilní fází. Pro docílení lepšího rozdělení látek byly desky vyvíjeny i opakovaně buď stejnou vyvíjecí soustavou nebo jinou, vždy ale až po odpaření

rozpouštědel. Detekce připravených chromatogramů probíhala pod UV (λ = 254 a 366 nm), označení oddělených zón byla provedena pomocí preparativní jehly. Zóny o stejném Rf ze všech použitých desek byly vyškrábány a spojeny. Získané zóny byly smíchány se stejným objemovým množstvím křemeliny a v koloně vymývány roztoky EtOH a $CHCl_3$.

4.2.1.6 Detekce alkaloidů

Detekce preparativních a kontrolních TLC pro zjištění čistoty izolovaných alkaloidů byla prováděna nejdříve za pomoci UV lampy (λ = 254 a 366 nm), následně po označení viditelných oddělených zón byly chromatogramy postříkány Dragendorffovým činidlem. Postřik činidlem pomohl detekovat alkaloidy, a to díky vzniku oranžového až oranžovočerveného zbarvení příslušné zóny.

4.2.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností

4.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací (EI)

K měření hmotnostních spekter byl využit spektrometr Agilent 7890A GC 5975 v módu 70 eV s GC kolonou DP-5 MS. Pro analýzu byly alkaloidy rozpuštěny v MeOH na koncentraci 1 $mg \cdot ml^{-1}$. Pro nástřik byl zvolen split mód v poměru 1:10. K detekci bylo využito srovnání spekter s NIST knihovnou a referenčními spektry alkaloidů dříve izolovaných na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky.

4.2.2.2 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI)

Měření hmotnostních spekter probíhalo na spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQ Duo s ionizací elektrosprejem v kladném modu a analyzátorem typu iontové pasti. Měření probíhalo při kolizní energii 40 eV. Rozpuštěné alkaloidy v MeOH (1 $mg \cdot ml^{-1}$) byly zaváděny pomocí sondy.

4.2.2.3 NMR analýza

NMR spektra byla měřena pomocí spektrometru VNMR S500 při teplotě 25 °C. Měření probíhalo při frekvenci 125,70 MHz pro jádra ^{13}C a 499,87 MHz pro jádra ^{1}H. Zaznamenané chemické posuny byly popsány jako hodnoty δ v jednotkách *pars per milion* (ppm) a byly vztaženy k hodnotám vnitřního standardu (TMS). Měření spekter probíhalo v různých prostředích. Hodnoty chemického posunu byly pro atomy ^{1}H δ = 7,26 ppm a ^{13}C δ = 77,0 ppm (v $CDCl_3$) a ^{1}H δ = 3,30 ppm a ^{13}C δ = 49,0 ppm (v CD_3OD). Ve výsledcích jsou naměřená data seřazena v pořadí: chemický posun δ, integrovaná intenzita ^{1}H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, dd = dublet dubletů, m = multiplet, bs = široký singlet) a interakční konstanta J (v Hz).

4.2.2.4 Optická otáčivost

K měření optické otáčivosti byly izolované sloučeniny rozpuštěny v $CHCl_3$ nebo v EtOH a měření probíhalo na polarimetru P 3000. Specifická optická otáčivost byla vypočtena podle vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \cdot \alpha}{c \cdot l}$$

t = teplota měření; D = sodíková D čára (589,3 nm); α = naměřená otáčivost [°]; c = koncentrace měřeného alkaloidu [g·100 m^{-1}]; l = délka kyvety [dm].

4.2.3 Stanovení biologické aktivity

4.2.3.1 Příprava hemolyzátu a plazmy

K přípravě hemolyzátu a plazmy byla použita krev zdravého dobrovolníka, která byla ihned po odběru smíchána s antikoagulačním činidlem (2 ml 3,4% citrátu sodného na 18 ml krve). Plazma byla z krve oddělena centrifugací (při 4 °C, rychlosti 4000 ot./min) na centrifuze Boeco U-32R, následně byla použita jako zdroj BuChE. Jako zdroj AChE sloužily oddělené erytrocyty.

Erytrocyty bylo potřeba třikrát promýt 5mM fosfátovým pufrem o pH 7,4 obsahujícím 150mM NaCl a poté zcentrifugovat (při 4 °C, rychlosti 4000 ot./min) na centrifuze Boeco U-32R. K promytým erytrocytům byl přidán 5mM fosfátový pufr pH 7,4, (tentokrát bez NaCl) v poměru 1 : 9 erytrocyty k pufru. Následně proběhla spontánní hemolýza erytrocytů za stálého míchání po dobu 10 min. Poté se stanovila absorbance BuChE v plazmě a AChE v hemolyzátu. Hodnota absorbance byla hodnota Dle potřeby upravena pomocí příslušného množství 5mM fosfátového pufru o pH 7,4. Enzymové preparáty byly zmraženy na teplotu −22 °C až do doby použití.

4.2.3.2 Stanovení absorbance enzymových preparátů a stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči lidským ChE

Pro stanovení inhibiční aktivity byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím Ellmanova činidla (DTNB). Během stanovení se měřil nárůst absorbance po dobu jedné minuty. Hodnoty IC_{50} byly získány pomocí výpočtu z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Získané hodnoty IC_{50} byly porovnány s hodnotami referenčních látek. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

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

% I = procento inhibice; ΔA_{Bl} = pokles absorbance slepého vzorku během 1 min; ΔA_{Sa} = absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Do 6 jamek mikrotitrační destičky bylo naneseno 8,3 µl plazmy, hemolyzátu nebo média a přidáno 283 µl 5mM DTNB a 8,3 µl DMSO, vše se nechalo po dobu 1 min promíchat

na mikrotřepačce a poté inkubovat v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 33,3 µl roztoku substrátu (10 mM ATChI nebo 10 mM BuTChI) a při příslušné vlnové délce λ = 436 nm (AChE), nebo λ = 412 nm (BuChE) je proměřena absorbance.

Pro stanovení aktivity látek byly napipetovány do mikrotitrační destičky stejné objemy činidel a roztoku substrátu a postup měření byl též shodný jako v předchozím odstavci, ale namísto 8,3 µl DMSO byl napipetován alkaloidní roztok příslušné koncentrace. Pro každý roztok bylo použito 6 jamek (1 řada), DMSO byl přidán a do poslední řady (namísto měřené látky) jako slepý vzorek. Při screeningovém měření se všechny látky měřily při koncentraci 100 µM. U látek, které vykazují při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 50 %, je stanovena IC_{50}.

4.3 Izolace alkaloidů z listů *Liriodendron tulipifera*

4.3.1 Příprava alkaloidního extraktu

Součástí experimentální části této práce nebyla příprava alkaloidního extraktu, využitý alkaloidní extrakt byl připraven prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc.

Na přípravu alkaloidního extraktu bylo použito 10,6 kg jemně řezaných listů *Liriodendron tulipifera* (Lindava 2010–2013, sběr 07–08, velikost do 5 mm). Po částech bylo toto množství dvakrát extrahováno za varu 95% ethanolem vždy pětinásobným množstvím rozpouštědla (objemově). Dalším krokem bylo spojit získané extrakty, zfiltrovat je a odpařit za snížené teploty a tlaku do řídkého roztoku. K tomuto zahřátému roztoku na teplotu 70 °C byly přidány 2 l vody a byl z něj oddestilován zbytek EtOH. Suspenze byla za tepla zředěna 6 litry 2% HCl, 6 l vody (pH bylo cca 1–2) a po zchladnutí byla zfiltrována přes vliselin. Kalný filtrát byl následně zfiltrován přes vrstvu křemeliny, takto vzniklý hnědý filtrát byl zalkalizován 10% Na_2CO_3 na pH 9–10 a získaný šedozelený kalný roztok byl vytřepán čtyřikrát 2,8 l $CHCl_3$. Po odpaření chloroformové fáze vznikl velmi viskózní tmavě červenohnědý odparek n = 52,3 g.

Bylo provedeno TLC sumárního chloroformového výtřepku v nasycené komoře směsí S1. TLC bylo dvakrát vyvíjeno na silikagelu, detekce pomocí UV při 254 nm a Dragendorffovým činidlem.

Obrázek 10 Sumární alkaloidní chloroformový výtřepek *Liriodendron tulipifera*

4.3.2 Čištění chloroformového extraktu a příprava alkaloidního Et_2O extraktu

52,3 g velmi viskózního hnědo-červeného odparku bylo rozehřáto na 70 °C, rozpuštěno v 300 ml 2% HCl, protřepáno a sonikováno (10 minut při 60 °C na stupni 10). Poté probíhala filtrace nahnědlého roztoku přes vliselin, zbytek byl v baňce promyt horkou vodou a roztok byl dále doplněn na jeden litr (pH 1). Po zchladnutí byl třikrát vytřepán 300 ml Et_2O (vzniklý extrakt již nebyl dále zpracováván), zbylý vodný roztok (kyselý) byl na pH 9–10 zalkalizován pomocí Na_2CO_3 (došlo k vyloučení alkaloidů) a následně třikrát vytřepán 400 ml $CHCl_3$. Po odpaření chloroformového roztoku vzniklo 9,4 g velmi viskózního, tmavě hnědého odparku.

Takto předčištěných 9,4 g chloroformového extraktu bylo za tepla rozpuštěno v 30 ml EtOH, roztok byl dále zředěn 30 ml H_2O a byl odpařen na vakuové odparce při 50 °C až do začátku destilace vody. K získanému roztoku bylo přidáno 100 ml 2% HCl, byla provedena tříminutová sonikace suspenze na ultrazvukové lázni, následná filtrace přes slabou vrstvu křemeliny a doplnění vodou na 200 ml. Vzniklý kyselý roztok (pH 1) byl třikrát vytřepán pomocí 150 ml Et_2O, etherové výtřepky již nebyly dále zpracovávány.

Kyselý roztok alkaloidů byl zalkalizován 10% Na_2CO_3 na pH 9–10. Získané alkaloidy byly následně pětkrát vytřepány 200 ml Et_2O, etherová vrstva ostře oddělena a při zahřátí na teplotu 40 °C došlo k odpaření rozpouštědla. Vzniklý světle hnědý krystalický odparek měl hmotnost 3,69 g.

Bylo provedeno TLC Et_2O výtřepku alkal. z bazického roztoku (pH 9–10). Komora byla nasycená vyvíjecí směsí S1, dvakrát vyvíjeno na silikagelu, detekce pomocí UV při 254 nm a Dragendorffovým činidlem.

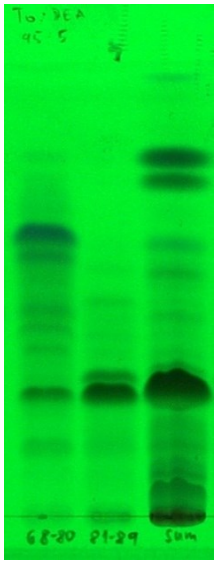
Obrázek 11 Přečištěný alkaloidní etherový výtřepek
Liriodendron tulipifera

4.3.3 Flash chromatografie přečištěného alkaloidního extraktu

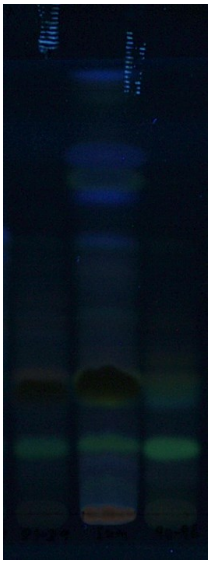
Získaný přečištěný Et_2O extrakt byl separován pomocí flash chromatografie, nicméně tato práce byla provedena Mgr. Ivanou Lakatošovou v rámci její kvalifikační práce, která nebyla doposud dokončena, proto zde bude uvedena pouze základní charakteristika chromatografie.

Pro chromatografii byl jako adsorbent použit Al_2O_3, přičemž eluce byla provedena gradientová s počáteční vyvíjecí směsí benzin : EtOAc 95 : 5 s rostoucím podílem EtOAc, po dosažení eluce pouze EtOAc byl následně do směsi přidáván zvyšující se podíl MeOH. Po eluci čistým MeOH a bylo přistoupeno k promytí kolony MeOH s přídavkem 0,1 % TFAA. Celkem bylo jímáno bylo 150 frakcí o objemu 25 ml.

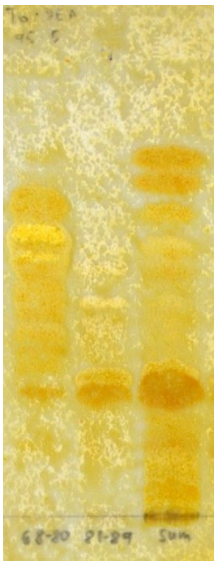
Obrázek 12 Chromatogramy frakcí (č. 68–80, č. 81–89) získané pomocí flash chromatografie vyvíjecí směsí $C_6H_5CH_3$ + Et_2NH (95:5)



UV při 254 nm

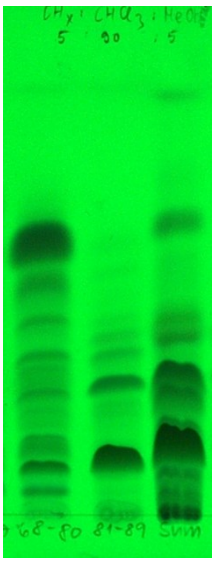


UV při 366 nm



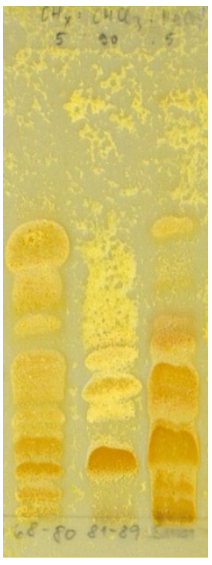
VIS po detekci Dr.činidlem

Obrázek 13 Chromatogramy frakcí (č. 68–80, č. 81–89) získané pomocí flash chromatografie vyvíjecí směsí C_6H_{12}+ $CHCl_3$ + MeOH (5:90:5)



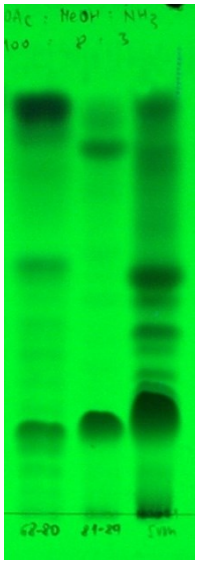
UV při 254 nm

UV při 366 nm



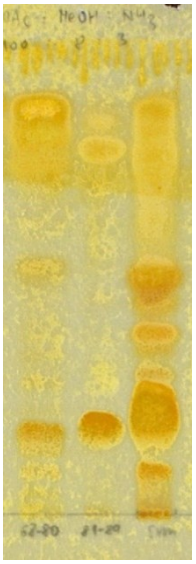
VIS po detekci Dr.činidlem

Obrázek 14 Chromatogramy frakcí (č. 68–80, č. 81–89) získané pomocí flash chromatografie vyvíjecí směsí EtOAc + MeOH + NH_3 (100:8:3)



UV při 254 nm

UV při 366 nm



VIS po detekci Dr.činidlem

4.3.4 Izolace alkaloidů z frakce č. 81–89

128,1 mg odparku frakce č. 81–89 bylo rozpuštěno směsí ethanolu a ethyl acetátu a následně naneseno na 4 preparativní desky o velikosti 15 × 15 cm. Z desek vyvíjených ve vyvíjecí soustavě S2 byly získány 3 zóny: LL81A = 28,3 mg, LL81B = 10,5 mg a LL81C = 29,9 mg. LL81A a LL81C byly po kontrolních TLC na deskách 3 × 10 cm ve vyvíjecích soustavách S1 a S3 zvoleny pro přečištění a s LL81B už se dále nepracovalo.

Pro přečištění LL81A a LL81C bylo využito nanesení těchto alkaloidních směsí na 2 a 2 komerční desky 20 × 10 cm, které se daly dvakrát vyvíjet do komory nasycené S1. Z desek LL81A i LL81C byla získána jedna zóna, která představovala čisté izolované látky: LL81A = 17,4 mg a LL81C = 14,9 mg.

4.3.5 Izolace alkaloidů z frakce č. 68–80

Z frakce č. 68–80 bylo získáno 195,0 mg odparku. Ten byl rozpuštěn a nanesen na 6 preparativních desek o velikosti 15 × 15 cm, které byly poté vyvíjeny ve vyvíjecí směsi S4. Touto preparativní metodou bylo získáno 6 zón: LL68A (44,6 mg), LL68B, LL68C, LL68D, LL68E (4,0 mg) a LL68F. Podle výsledků GC-MS měla být LL68A složena ze dvou sloučenin, proto byla zvolena pro přečištění, s LL68B, LL68C, LL68D, a LL68F už se dále nepracovalo a LL68E byla díky výsledkům z GC-MS shledána čistou sloučeninou se shodnou *m/z* jako LL81C.

LL68A byla pro přečištění nanesena na 3 desky 20 × 10 cm, které byly vyvíjeny ve směsi S5 a byly z nich získány 2 zóny LL68A1 a LL68A2. Sloučenina LL68A1 byla dále nanesena na 2 desky 20 × 10 cm vyvíjené vyvíjecí směsi S1. Byly získány 4 zóny: LL68A1.1, LL68A1.2, LL68A1.3 a LL68A1.4. Po GC-MS analýze získaných sloučenin se bohužel žádná nezdála jako čistý alkaloid. Proto ze zvolené LL68A1.1 byla o snaha o další izolaci a přečištění pomocí TLC. 18,3 mg LL68A1.1 bylo naneseno na 2 desky o velikosti 20 × 10 cm a vyvíjeno vyvíjecí směsí S6. Byly získány dvě zóny, které ovšem také nebyly čisté a po jejich nanesení na 1 a 1 desku 10 × 10 cm vyvíjenou směsí S7 byla získána jedna zóna LL68A1.2.1, která podle analýzy GC-MS bohužel také nebyla vyhodnocena jako čistá látka. Z důvodů malého množství izolovaných sloučenin už se k dalšímu přečišťováni nepřistoupilo.

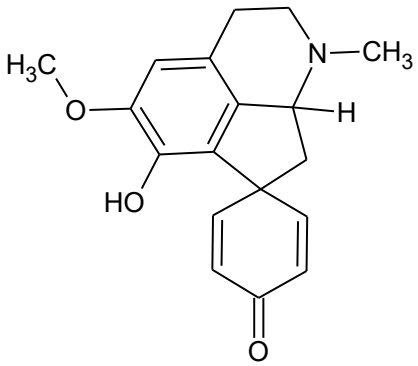
5. VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných alkaloidů

5.1.1 LL81C: Glaziovin

sumární vzorec: $C_{18}H_{19}NO_3$

Obrázek 15 Glaziovin



5.1.1.1 MS analýza

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 275($M^{+\cdot}$, 100), 246(14), 217(10), 188(18), 162(9).

5.1.1.2 NMR analýza

Změřená spektra byla ve shodě s literaturou [119].

5.1.1.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost se nepodařila změřit ani u jednoho ze tří měření. I přes nízké koncentrace roztoku glaziovinu a vyzkoušení dvou různých rozpouštědel.

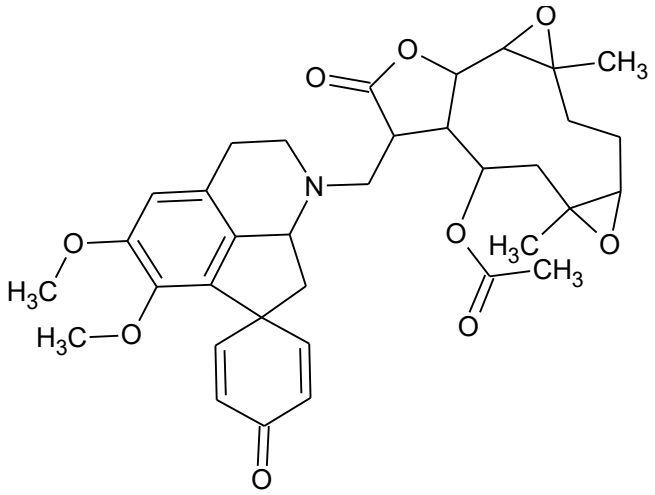
1. Měření: c = 0,125 g/100 ml; CHCl3; růžovočervené zbarvení; 31,6 °C
2. Měření: c = 0,105 g/100 ml; CHCl3; růžovočervené zbarvení; 33,5 °C
3. Měření: c = 0,100 g/100 ml; EtOH; hnědorůžové zbarvení; 33,5 °C

5.1.2 LL81A: Derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem

Jde o předběžný výsledek, který patrně bude ověřován.

sumární vzorec: $C_{35}H_{41}NO_9$

Obrázek 16 Derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem



5.1.2.1 MS analýza

MS (ESI): m/z (%) = $[M+H]^+$ 620 (100), $[M+Na]^+$ 642 (9), 604 (4)

5.1.2.2 NMR analýza

NMR spektrum bylo porovnáno se spektry jednotlivých částí, které jsou dostupné v literatuře [119], [120]. Interpretace naměřeného spektra zde není uvedena z důvodu plánované publikace dosud nepublikovaných látek z taxonu *Liriodendron tulipifera*.

5.1.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{33}$ = 293,9° (c = 0,106; $CHCl_3$)

5.2 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči AChE, BuChE

U glaziovinu byla naměřena inhibiční aktivita vůči AChE (IC_{50} > 1000 μM) a vůči BuChE (IC_{50} = 517,35 ± 71,62 μM).

Tabulka 3 Biologická aktivita izolovaného alkaloidu

Alkaloid	IC_{50} [μM]	
	AChE	BuChE
Glaziovin (LL81C)	> 1000*	517,35 ± 71,62*
Standardy		
(−)−Galantamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
(−)−Huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000
Berberin	0,705 ± 0,104	30,72 ± 3,49

* hodnoty změřené již dříve v rámci experimentální práce na katedře

6. DISKUSE

V rámci této diplomové práce byly pomocí tenkovrstvé chromatografie zpracovány 2 frakce alkaloidního extraktu z listů druhu *Liriodendron tulipifera* L., které byly předem separovány za pomoci flash chromatografie. Z frakcí se podařilo v čisté formě izolovat proaporfinový alkaloid glaziovin a derivát proaporfinového alkaloidu stefarinu se seskviterpenoidem lanuginolid epoxidem.

Přítomnost alkaloidu glaziovinu byla z rostlinných orgánů *L. tulipifera* popsána pouze v listech [22]. Glaziovin se dále vyskytuje v rostlinách čeledi vavřínovité, byl izolován ze dvou druhů *Ocotea*: *O. glaziovii* [121] a *O. brachybotra* [122]. Izolace tohoto alkaloidu byla také popsána z tropických druhů rostlin jako *Annona purpurea* [123], *Cinnamomum philippinense* [124], *Hypserpa nitida* [125], *Nelumbo nucifera* [126], *Neolitsea konishii* [127] a *Peumus boldus* [119].

Izolovaný derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem v současné době není v literatuře popsán, nicméně pro proaporfinové alkaloidy i seskviterpenoidy je výskyt v rostlinách typický. Alkaloid stefarin je charakteristickým metabolitem lián rodu *Stephania* z čeledi Menispermaceae, byl izolován z druhů *S. viridiflavens* [128], *S. cambodica* [129], *S. dentifolia* [130], *S. glabra* [131] a *S. cepharantha* [132]. Také se vyskytuje v čeledi Annonaceae: *Artabotrys uncinatus* [133], *Asimina triloba* [134] a *Monodora brevipes* [135] a byl izolován i z rostliny *Abuta panurensis* [136]. Izolace seskviterpenoidu lanuginolid epoxidu byla popsána pouze jednou a to z rostliny *Michelia lanuginosa*, která pochází ze stejné čeledi jako *L. tulipifera* [137].

Optická otáčivost glaziovinu se nepodařila změřit a to i přes nízké koncentrace roztoku a vyzkoušení dvou různých rozpouštědel ani u jednoho ze tří měření. Dle NMR analýzy byl sice izolovaný glaziovin vyhodnocen jako velmi čistý, nicméně stopy nečistot zabarvovaly roztok růžovočerveně a polarizované světlo neprocházelo kyvetou v dostatečné intenzitě pro změření. V literatuře je u glaziovinu uváděna otáčivost $[\alpha]_D^{25} = -95°$ (c = 0,1; $CHCl_3$) [138] a $[\alpha]_D^{25} = -30{,}2°$ (c = 0,1013; $CHCl_3$) [119].

U derivátu stefarinu s lanuginolid epoxidem je možné porovnat naměřenou optickou otáčivost $[\alpha]_D^{33}$ = 293,9° (c = 0,106; CHCl3) pouze s hodnotami jednotlivých částí uvedených v literatuře. U stefarinu byly naměřeny hodnoty $[\alpha]_D^{25} = +194°$ (c = 5,0; CHCl3)

[139] a $[\alpha]_D^{25} = +143°$ (c = 0,26; CHCl3) [140] a u lanuginolid epoxidu byla hodnota sice $[\alpha]_D = -78°$ (0,63; CHCl3), ale měření proběhlo pouze jednou [137].

Naměřená NMR spektra byla porovnána s literaturou a odpovídala hodnotám uvedeným jak pro glaziovin [119], tak pro derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem, u kterého byla porovnána se spektry jednotlivých částí [120], [119].

Inhibiční aktivita glaziovinu vůči AChE (IC_{50} > 1000 μM) a BChE (IC_{50} = 517,35 ± 71,62 μM) je nevýznamná a potenciální uplatnění v terapii AD je tak nepravděpodobné. Jiné studie se o měření inhibiční aktivity glaziovinu nepokoušely.

Inhibiční aktivita derivátu stefarinu s lanuginolid epoxidem prozatím měřena nebyla, nicméně se jeví jako vhodné inhibiční účinek této sloučeniny v budoucnu změřit. U alkaloidu stefarinu byla totiž zjištěna středně silná inhibiční aktivita v hodnotách IC_{50}= 74,58 ± 0,03 μM [136] a IC_{50}= 61,24 ± 0,03 μM [120]. A nedávné studie ukazují, že i přes velkou strukturální diverzitu seskviterpenoidů má výzkum této skupiny sloučenin z hlediska jejich inhibiční aktivity veliký potenciál. Například ve studii zabývající se jejich inhibiční aktivitou, 12 sloučenin z celkového počtu 58 různých seskviterpenů mělo IC_{50} < 9 μM [141] a u mnoha dalších podobných studií nejrůznějších typů seskviterpenoidů se objevují hodnoty IC_{50} < 50 μM [141], [142], [143]. Jiné studie ovšem tak slibné výsledky inhibiční aktivity neuvádějí [144], [145].

V závěru lze konstatovat, že glaziovin pravděpodobně nemá potenciál být využit při terapii AD. Derivát stefarinu s lanuginolid epoxidem by ale slibným kandidátem být mohl, což potvrzují dobré inhibiční účinky stefarinu a seskviterpenoidů popsané v literatuře, nicméně je nejprve zapotřebí změřit inhibiční aktivitu přímo této sloučeniny.

7. POUŽITÁ LITERATURA

[1] GIACOBINI, E., A. CUELLO a A. FISHER. Reimagining cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Brain* [online]. 2022, **145**(7), 2250-2275 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awac096

[2] MUKHERJEE, P. K., V. KUMAR, M. MAL a P. J. HOUGHTON. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* [online]. 2007, **14**(4), 289-300 [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2007.02.002

[3] RIVERS, M.C. *Liriodendron tulipifera*. In: *The IUCN Red List of Threatened Species* [online]. Velká Británie, 2014 [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: https://www.iucnredlist.org/species/194015/2294401#geographic-range

[4] EHRET, G.D. a J.J. HAID. *Liriodendron tulipifera*: Tulip Tree Botanical Art Print. In: *Etsy.com* [online]. Anglie, 1990 [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: https://www.etsy.com/in-en/listing/1110662974/tulip-tree-botanical-art-print-1700s?show_sold_out_detail=1&ref=nla_listing_details

[5] USDA PLANTS Database: Natural Resources Conservation Service. In: *United States Department of Agriculture* [online]. 2018 [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=LITU

[6] Flora of North America Vol. 3. In: *EFloras.org* [online]. Missouri Botanical Garden, 2008 [cit. 2022-12-05]. Dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=200008463

[7] PARKS, C. a J. WENDEL. Molecular Divergence Between Asian and North American Species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with Implications for Interpretation of Fossil Floras. *American Journal of Botany* [online]. 1990, **77**(10), 1243-1253 [cit. 2022-12-05]. Dostupné z: doi:10.2307/2444585

[8] CHEN, J., Z. HAO, X. GUANG et al. *Liriodendron* genome sheds light on angiosperm phylogeny and species–pair differentiation. *Nature Plants* [online]. 2019, **5**, 18-24 [cit. 2022-12-05]. Dostupné z: doi:10.1038/s41477-018-0323-6

[9] GRIFFITH, E.R. Medical Botany: or Descriptions of the More Important Plants Used in Medicine, with Their History, Properties, and Mode of Administration [online]. In: . Philadelphia: *Lea and Blanchard*, 1847, s. 96–100 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: https://www.biodiversitylibrary.org/item/120998#page/104/mode/1up

[10] MILLSPAUGH, C.F. Medicinal Plants: An Illustrated andDescriptive Guide to Plants Indigenous to and Naturalized in the United States which are Used in Medicine [online]. In: . New York: *Dover Publications*, 1975, s. 12-2 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: https://www.biodiversitylibrary.org/item/28893#page/54/mode/1up

[11] DETTWEILER, M., J. LYLES, K. NELSON, B. DALE, R. REDDINGER, D. ZURAWSKI a C. QUAVE. American Civil War plant medicines inhibit growth, biofilm formation, and quorum sensing by multidrug-resistant bacteria. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 1-10 [cit. 2023-03-30]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-44242-y

[12] KIRK, R., M. ROSARIO, N. OBLIE et al. Screening the PRISM Library against Staphylococcus aureus Reveals a Sesquiterpene Lactone from *Liriodendron tulipifera* with Inhibitory Activity. *ACS Omega* [online]. 2022, **7**(40), 35677-35685 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.2c03539

[13] PARK, I., H. BYUN, G. HUR a M. NA. Tulipiferamide A, an Alkamide from *Liriodendron tulipifera* , Exhibits an Anti-Inflammatory Effect via Targeting IKKβ Phosphorylation. *Journal of Natural Products* [online]. 2021, **84**(5), 1598-1606 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00146

[14] FENG, Ch., B.G. LI, X.P. GAO, H.Y. QI a G.L. ZHANG. A new triterpene and an antiarrhythmic liriodendrin from *Pittosporum brevicalyx*. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2010, **33**(12), 1927-1932 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-010-1206-1

[15] SOHN, Y., S. HWANG, S. LEE et al. Protective Effect of Liriodendrin Isolated from *Kalopanax pictus* against Gastric Injury. *Biomol. Ther.* [online]. 2015, **23**(1), 53-54 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4286750&blobtype=pdf

[16] YANG, Y., Z. TANG, Y. WEI, X. CHEN a X. JIANG. Hypoglycemic effects of active constituents extracted from the stem bark of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. in Guangxi. *Medical Journal of Wuhan University* [online]. 2008, **29**(6), 759-762 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/289757303_Hypoglycemic_effects_of_active_constituents_extracted_from_the_stem_bark_of_Kalopanax_septemlobus_Thunb_Koidz_in_Guangxi

[17] YU, Z. a G. CHENG. Protective effect of Liriodendrin against liver ischemia/reperfusion injury in mice via modulating oxidative stress, inflammation and NF-κB/TLR-4 pathway. *Folia Morphologica* [online]. 2022, 1-2 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1644-3284. Dostupné z: doi:10.5603/FM.a2022.0049

[18] LI, Wei-Jen, Yi-Chieh LIN, Pei-Fang WU, Zhi-Hong WEN, Po-Len LIU, Chung-Yi CHEN a Hui-Min WANG. Biofunctional Constituents from *Liriodendron tulipifera* with Antioxidants and Anti-Melanogenic Properties. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(1), 1698-1712 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms14011698

[19] KANG, Y.F., Ch.M. LIU, Ch.L. KAO a Ch.Y. CHEN. Antioxidant and Anticancer Constituents from the Leaves of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules* [online]. 2014, **19**(4), 4234-4245 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules19044234

[20] CHIU, C.C., H.L. CHOU, P.F. WU, H.L. CHEN, H.M. WANG a C.Y. CHEN. Bio-Functional Constituents from the Stems of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules* [online]. 2012, **17**(4), 4357-4372 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules17044357

[21] HEJNÝ, S. a B. SLAVÍK. In: Květena české socialistické republiky 1. Praha: *Academia*, 1988, s. 347.

[22] ZIYAEV, R., A. ABDUSAMATOV a S. YUNUSOV. Alkaloids of *Liriodendron tulipifera*. *Chemistry of Natural Compounds* [online]. 1987, **23**(5), 521–528 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: doi:10.1007/bf00598665

[23] ZIYAEV, R., A. ABDUSAMATOV a S. YUNUSOV. The dynamics of the accumulation and mutual transformation of alkaloids in *Liriodendron tulipifera*. *Chemistry of Natural Compounds* [online]. 1975, **11**(4), 495–497 [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: doi:10.1007/bf00566793

[24] ZIYAEV, R., K. IKRAMOV, K. KADYROV a A. ABDUSAMATOV. Alkaloids of *Liriodendron tulipifera*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1991, **27**(4), 516-517. Dostupné z: doi:10.1007/BF00636592

[25] LEE, C.H., H.L. CHEN, Z.L. HONG, C.W. HSIEH, S.W. JUAN, J.C. HUANG, H.M. WANG a C.Y. CHEN. Chemical Constituents of *Liriodendron tulipifera*. *Chemistry of Natural Compounds* [online]. 2013, **49**(2), 398-400 [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: doi:10.1007/s10600-013-0621-1

[26] CHEN, C., C. KAO, W. LI, M. HUANG a H. LI. A New Aristolactam Alkaloid from *Liriodendron tulipifera*. *Chemistry of Natural Compounds* [online]. 2018, **54**(3), 502-503 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0009-3130. Dostupné z: doi:10.1007/s10600-018-2389-9

[27] HSU, C. a C. CHEN. Antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from heartwood and discolored sapwood of *Liriodendron tulipifera*. *Holzforschung*. 1991, **45**(5), 325.

[28] HRUŠKOVÁ, M. Alkaloidy dřeva druhu Liriodendron tulipifera L. a jejich aktivita vůči lidským cholinesterasam. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Vedoucí práce A. Hošťálková.

[29] PARK, I.W. a M.K. NA. NMR Assignments of Rotameric Aporphine Alkaloids from *Liriodendron tulipifera. Natural Product Sciences* [online]. 2020, **26**(2), 171-175 [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: doi:10.20307/nps.2020.26.2.171

[30] LI, H.T., H.M. WU, H.L. CHEN, C.M. LIU a C.Y. CHEN. The Pharmacological Activities of (−)-Anonaine. *Molecules* [online]. 2013, **18**(7), 8257-8263 [cit. 2023-04-03]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules18078257

[31] CHEN, Bing-Hung, Hsueh-Wei CHANG, Hsuan-Min HUANG, Inn-Wen CHONG, Jia-Shing CHEN, Chung-Yi CHEN a Hui-Min WANG. (−)-Anonaine Induces DNA Damage and Inhibits Growth and Migration of Human Lung Carcinoma H1299 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, **59**(6), 2284-2290 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf103488j

[32] VALIENTE, M., P. D'OCON, M. NOGUERA, B. CASSELS, C. LUGNIER a M. IVORRA. Vascular Activity of (-)-Anonaine, (-)-Roemerine and (-)-Pukateine, Three Natural 6a(R)-1,2-Methylenedioxyaporphines with Different Affinities for α 1 -Adrenoceptor Subtypes. *Planta Medica* [online]. 2004, **70**(7), 603-609 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0032-0943. Dostupné z: doi:10.1055/s-2004-827181

[33] MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M., R. ESTRADA-REYES, A.G. ARAUJO ESCALONA, I. LEDESMA VELÁZQUEZ, L. MARTÍNEZ-MOTA, J. MORENO a G. HEINZE. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2012, **139**(1), 164-170 [cit. 2023-04-03]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2011.10.033

[34] GALARCE-BUSTOS, O., J. PAVÓN, K. HENRÍQUEZ-AEDO a M. ARANDA. Detection and identification of acetylcholinesterase inhibitors in *Annona cherimola* Mill. by effect-directed analysis using thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* [online]. 2019, **30**(6), 679-686 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: doi:10.1002/pca.2843

[35] GRAZIOSE, R., T. RATHINASABAPATHY, C. LATEGAN, A. POULEV, P. SMITH, M. GRACE, M. LILA a I. RASKIN. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2011, **133**(1), 26-30 [cit. 2023-04-03]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2010.08.059

[36] HENG, H., C. CHEE, S. CHIN et al. Synthesis and evaluation of nuciferine and roemerine enantiomers as 5-HT 2 and α 1 receptor antagonists. *MedChemComm* [online]. 2018, **9**(3), 576-582 [cit. 2023-04-03]. ISSN 2040-2503. Dostupné z: doi:10.1039/C7MD00629B

[37] KANG, H., S.W. JANG, J. PAK a S. SHIM. Glaucine inhibits breast cancer cell migration and invasion by inhibiting MMP-9 gene expression through the suppression of NF-κB activation. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2015, **403**(1-2), 85-94 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0300-8177. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-015-2339-9

[38] CORTIJO, J., V. VILLAGRASA, R. PONS et al. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *British Journal of Pharmacology* [online]. 1999, **127**(7), 1641-1651 [cit. 2023-04-03]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0702702

[39] ORALLO, F., A. ALZUETA, M. CAMPOS-TOIMIL a J. CALLEJA. Study of the in vivo and in vitro cardiovascular effects of ( )-glaucine and N-carbethoxysecoglaucine in rats. *British Journal of Pharmacology* [online]. 1995, **114**(7), 1419-1427 [cit. 2023-04-03]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb13364.x

[40] DAMAYANTI, D., D. UTOMO a C. KUSUMA. Revealing the potency of *Annona muricata* leaves extract as FOXO1 inhibitor for diabetes mellitus treatment through computational study. *In Silico Pharmacology* [online]. 2017, **5**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2193-9616. Dostupné z: doi:10.1007/s40203-017-0023-3

[41] HENG, H., C. CHEE, C. THY et al. In vitro functional evaluation of isolaureline, dicentrine and glaucine enantiomers at 5-HT 2 and α 1 receptors [online]. 2019, **93**(2), 132-138 [cit. 2023-04-04]. ISSN 17470277. Dostupné z: doi:10.1111/cbdd.13390

[42] ELEKOFEHINTI, O., A. LAWAL, O. EJELONU, O.i MOLEHIN a C. FAMUSIWA. Involvement of fat mass and obesity gene (FTO) in the anti-obesity action of *Annona muricata* Annonaceae: in silico and in vivo studies. *J Diabetes Metab Disord* [online]. 2020, **19**(1), 197-204 [cit. 2023-04-04]. ISSN 2251-6581. Dostupné z: doi:10.1007/s40200-020-00491-7

[43] BIAN, Z., W. ZHANG, J. TANG et al. Mechanisms Underlying the Action of *Ziziphi Spinosae* Semen in the Treatment of Insomnia: A Study Involving Network Pharmacology and Experimental Validation. *Front Pharmacol* [online]. 2021, **12** [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.752211

[44] LIN, R.J., M.H. WU, Y.H. MA, L.Y. CHUNG, C.Y. CHEN a C.M. YEN. Anthelmintic Activities of Aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rosa-plena against *Hymenolepis nana*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(3), 3624-3639 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15033624

[45] FOURNET, A., M. FERREIRA, A. ROJAS DE ARIAS, I. GUY, H. GUINAUDEAU a H. HEINZEN. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia* [online]. 2007, **78**(5), 382-384 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0367326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2007.03.003

[46] LIU, C.M., C.L. KAO, H.M. WU, W.J. LI, C.T. HUANG, H.T. LI a C.Y. CHEN. Antioxidant and Anticancer Aporphine Alkaloids from the Leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rosa-plena. *Molecules* [online]. 2014, **19**(11), 17829-17838 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules191117829

[47] CAO, T.W., C.L. XIE, C.Q. CHEN, Z.H. HE, Q.X. YAN, G. XU a X.W. YANG. Anti-Food Allergic Alkaloids from the Lotus Seed Pot. *Chem Biodivers* [online]. 2021, **18**(12) [cit. 2023-04-04]. ISSN 1612-1872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.202100770

[48] YANO, M., S. NAKASHIMA, Y. ODA, S. NAKAMURA a H. MATSUDA. BBB-permeable aporphine-type alkaloids in *Nelumbo nucifera* flowers with accelerative effects on neurite outgrowth in PC-12 cells. *Journal of Natural Medicines* [online]. 2020, **74**(1), 212-218 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1340-3443. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-019-01368-7

[49] GUAN, J., Y. XU, W. YU et al. Biosensor-based active ingredient recognition system for screening TNF-α inhibitors from lotus leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2023, **415**(9), 1641-1655 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-023-04565-2

[50] KUO, P.C., Y.H. WU, H.Y. HUNG et al. Anti-inflammatory principles from *Lindera aggregata*. *Bioorg Med Chem Lett* [online]. 2020, **30**(13) [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2020.127224

[51] MADAPA, S. a W. HARDING. Semisynthetic Studies on and Biological Evaluation of N -Methyllaurotetanine Analogues as Ligands for 5-HT Receptors. *Journal of Natural Products* [online]. 2015, **78**(4), 722-729 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/np500893h

[52] HUNG, I., S. CHANG, P. CHANG, C. LEE a C. CHEN. Memory enhancement by traditional Chinese medicine?. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 2013, **31**(12), 1411-1439 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2012.741052

[53] YANG, J., Y. ZHANG, L. JIANG et al. A triple combination strategy of UHPLC-MSn, hypolipidemic activity and transcriptome sequencing to unveil the hypolipidemic mechanism of *Nelumbo nucifera a*lkaloids. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2022, **282** [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2021.114608

[54] CAMPOS, L., A. LEMOS, I. DINIZ et al. Antifungal *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell envelope of multi-drug resistant *Candida albicans. Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2023, **301** [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2022.115856

[55] CORTES, D., M. TORRERO, M. D'OCON, M. CANDENAS, A. CAVÉ a A. HADI. Norstephalagine et Atherospermidine, Deux Aporphines d'*Artabotrys maingayi* Relaxantes du Muscle Lisse. *Journal of Natural Products* [online]. 1990, **53**(2), 503-508 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1021/np50068a039

[56] PROTAIS, P., J. ARBAOUI, E.H. BAKKALI, A. BERMEJO a D. CORTES. Effects of Various Isoquinoline Alkaloids on In Vitro 3 H-Dopamine Uptake by Rat Striatal Synaptosomes. *Journal of Natural Products* [online]. 1995, **58**(10), 1475-1484 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1021/np50124a001

[57] KHAN, S., H. KHAN, F. KHAN et al. Anti-Alzheimer and Antioxidant Effects of *Nelumbo nucifera* L. Alkaloids, Nuciferine and Norcoclaurine in Alloxan-Induced Diabetic Albino Rats. *Pharmaceuticals* [online]. 2022, **15**(10) [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.3390/ph15101205

[58] SONG, C., J. CAO, Y. LEI et al. Nuciferine prevents bone loss by disrupting multinucleated osteoclast formation and promoting type H vessel formation. *The FASEB Journal* [online]. 2020, **34**(3), 4798-4811 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1096/fj.201902551R

[59] LI, D., B. LIU, Y. FAN et al. Nuciferine protects against folic acid-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2021, **178**(5), 1182-1199 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1111/bph.15364

[60] DENG, H., Q. XU, X.T. SANG et al. Study on the vasodilatory activity of lotus leaf extract and its representative substance nuciferine on thoracic aorta in rats. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2022, **13** [cit. 2023-04-05]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.946445

[61] HARISHKUMAR, R. a C. SELVARAJ. Nuciferine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. attenuates isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Biotechnology and Applied Biochemistry* [online]. 2022, **69**(3), 1176-1189 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1002/bab.2194

[62] MA, C., F. DU, L. YAN et al. Potent Activities of Roemerine against *Candida albicans* and the Underlying Mechanisms. *Molecules* [online]. 2015, **20**(10), 17913-17928 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules201017913

[63] BAYAZEID, O., E. NEMUTLU, C. EYLEM et al. Neuroactivity of the naturally occurring aporphine alkaloid, roemerine. *Natural Product Research* [online]. 2021, **35**(24), 6147-6152 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2020.1830395

[64] MA, H.B., Z.S. TIAN, S.L. GUI, W.G. CUI a W. LI. Anti-prostate cancer effect of roemerine: An experimental study. *Zhonghua Nan Ke Xue* [online]. 2017, **23**(1), 27-33 [cit. 2023-04-05]. PMID: 29658233. Dostupné z: https://europepmc.org/article/med/29658233

[65] MOHAMED, S.M., E.M. HASSAN a N.A. IBRAHIM. Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. *Natural Product Research* [online]. 2009, **24**(15), 1395-1402 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.1080/14786410902906959

[66] SONI, V., D. YADAV, N. BANO et al. N-methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. *Fitoterapia* [online]. 2012, **83**(1), 110-116 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2011.09.019

[67] TAN, K., T. KHOO, M. RAJAGOPAL a C. WIART. Antibacterial alkaloids from *Artabotrys crassifolius* Hook.f. & Thomson. *Natural Product Research* [online]. 2015, **29**(24), 2346-2349 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2015.1013954

[68] COSTA, E., M. PINHEIRO, A. BARISON, F. CAMPOS, M. SALVADOR, B. MAIA, E. CABRAL a M. EBERLIN. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and Their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Natural Products* [online]. 2010, **73**(6), 1180-1183 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.1021/np100013r

[69] BI, R., X.N. YANG, H.F. ZHOU, L.Y. PENG, J.X. LIU a Q.S. ZHAO. Eleven undescribed alkaloids from the rhizomes of *Sinomenium acutum* and their IDO1 and TDO inhibitory activities. *Phytochemistry* [online]. 2022, **200** [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2022.113244

[70] QIN, J.L., T. MENG, Z.F. CHEN, X.L. XIE, Q.P. QIN, X.J. HE, K.B. HUANG a H. LIANG. Facile total synthesis of lysicamine and the anticancer activities of the RuII, RhIII, MnII and ZnII complexes of lysicamine. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(35), 59359-59375 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.19584

[71] CHANG, W.L., C.H. CHUNG, Y.C. WU a M.J. SU. The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia–reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric Oxide* [online]. 2004, **11**(4), 307-315 [cit. 2023-04-17]. ISSN 10898603. Dostupné z: doi:10.1016/j.niox.2004.10.004

[72] LI, Z.H., J. GAO, P.H. HU a J.P. XIONG. Anticancer effects of liriodenine on the cell growth and apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through the upregulation of p53 expression. *Oncology Letters* [online]. 2017, **14**(2), 1979-1984 [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2017.6418

[73] LIN, C.H., C.M. YANG, F.N. KO, Y.C. WU a C.M. TENG. Antimuscarinic action of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, in canine tracheal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* [online]. 1994, **113**(4), 1464-1470 [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb17161.x

[74] NAWAVI, A., C. MA, N. NAKAMURA, M. HATTORI, M. KUROKAWA, K. SHIRAKI, N. KASHIWABA a M. ONO. Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Alkaloids Isolated from *Stephania cepharantha. Biological and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1999, **22**(3), 268-274 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.22.268

[75] SHI, D., L. LIU, H. LI, D. PAN, X. YAO, W. XIAO, X. YAO a Y. YU. Identifying the molecular basis of Jinhong tablets against chronic superficial gastritis via chemical profile identification and symptom-guided network pharmacology analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2022, **12**(1), 65-76 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2021.01.005

[76] XU, W., Y. WANG, Z. MA et al. L-Isocorypalmine reduces behavioral sensitization and rewarding effects of cocaine in mice by acting on dopamine receptors. *Drug and Alcohol Dependence* [online]. 2013, **133**(2), 693-703 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.08.021

[77] CHLEBEK, J., A. DE SIMONE, A. HOŠŤÁLKOVÁ et al. Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. *Fitoterapia* [online]. 2016, **109**, 241-247 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2016.01.008

[78] HUNG, T., P. THUONG, N. NHAN et al. Cholinesterase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Corydalis Tuber*. *Natural Product Sciences* [online]. 2011, **17**(2), 108-112 [cit. 2023-04-18].

[79] GUTIÉRREZ, L., A. MURRAY, C. PUNGITORE a V. CAVALLARO. Aporphinoid Alkaloids Derivatives as Selective Cholinesterases Inhibitors: Biological Evaluation and Docking Study. *Molecular Informatics* [online]. 2020, **39**(11), 1-7 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: doi:10.1002/minf.201900125

[80] CHLEBEK, J., K. MACÁKOVÁ, L. CAHLÍKOVÁ, M. KURFÜRST, J. KUNEŠ a L. OPLETAL. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* [online]. 2011, **6**(5), 607-610 [cit. 2023-04-18].

[81] SRIPRANG, S., N. KHORANA a K. INGKANINAN. Acetylcholinesterase Inhibitor from *Stephania suberosa* Forman. *NU Science Journal* [online]. 2006, **3**(1), 1-11 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: https://www.thaiscience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/62/10036624.pdf

[82] HUNG, T., N. DANG, J. KIM et al. Alkaloids from Roots of *Stephania rotunda* and Their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Planta Medica* [online]. 2010, **76**(15), 1762-1764 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: doi:10.1055/s-0030-1249814

[83] BARBOSA, M., A. JUSTINO, M. MARTINS et al. Cholinesterase inhibitors assessment of aporphine alkaloids from *Annona crassiflora* and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2022, **120** [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2021.105593

[84] TSAI, S. a S. LEE. Characterization of Acetylcholinesterase Inhibitory Constituents from *Annona glabra* Assisted by HPLC Microfractionation. *Journal of Natural Products* [online]. 2010, **73**(10), 1632-1635 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: doi:10.1021/np100247r

[85] COMETA, M., S. FORTUNA, G. PALAZZINO, M. VOLPE, E. RENGIFO SALGADO, M. NICOLETTI a L. TOMASSINI. New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Fitoterapia* [online]. 2012, **83**(3), 476-480 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2011.12.015

[86] WAN OTHMAN, W., S. LIEW, K.Y. KHAW, V. MURUGAIYAH, M. LITAUDON a K. AWANG. Cholinesterase inhibitory activity of isoquinoline alkaloids from three *Cryptocarya species* (Lauraceae). *Bioorg Med Chem* [online]. 2016, **24**(18), 4464-4469 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2016.07.043

[87] Alzheimer's Disease Fact Sheet. In: *NIH: National Institute on Aging* [online]. Rockville Pike, Maryland: U.S. Department of Health and Human Services, 2023 [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet

[88] MASTERS, C., R. BATEMAN, K. BLENNOW, C. ROWE, R. SPERLING a J. CUMMINGS. Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2015, **1**(1) [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2015.56

[89] Alzheimer's Association: Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* [online]. 2019, **15**(3), 321–387 [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: https://www.alz.org/media/documents/alzheimers-facts-and-figures-2019-r.pdf

[90] DUNCOMBE, J., A. KITAMURA, Y. HASE, M. IHARA, R. N. KALARIA a K. HORSBURGH. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clinical Science* [online]. 2017, **131**(19), 2451-2468 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1042/CS20160727

[91] KINNEY, J., S. BEMILLER, A. MURTISHAW, A. LEISGANG, A. SALAZAR a B. LAMB. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* [online]. 2018, **4**(1), 575-590 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.trci.2018.06.014

[92] CUYVERS, E. a K. SLEEGERS. Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *The Lancet Neurology* [online]. 2016, **15**(8), 857-868 [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(16)00127-7

[93] WISEMAN, F., T. AL-JANABI, J. HARDY, A. KARMILOFF-SMITH, D. NIZETIC, V. TYBULEWICZ, E. FISHER a A. STRYDOM. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2015, **16**(9), 564-574 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1038/nrn3983

[94] STAMPFER, M. J. Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *Journal of Internal Medicine* [online]. 2006, **260**(3), 211-223 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01687.x

[95] CACCIOTTOLO, M., X. WANG, I. DRISCOLL et al. Particulate air pollutants, APOE alleles and their contributions to cognitive impairment in older women and to amyloidogenesis in experimental models. *Translational Psychiatry* [online]. 2017, **7**(1), 1022-1022 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1038/tp.2016.280

[96] NERI, L.C. a D. HEWITT. Aluminium, Alzheimer's disease, and drinking water. *The Lancet* [online]. 1991, **338**(8763), 390 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1016/0140-6736(91)90531-S

[97] JUSTICE, N. J. The relationship between stress and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Stress* [online]. 2018, **8**, 127-133 [cit. 2023-08-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ynstr.2018.04.002

[98] BREIJYEH, Z. a R. KARAMAN. Comprehensive Review on Alzheimer’s Disease: Causes and Treatment. *Molecules* [online]. 2020, **25**(24) [cit. 2023-08-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25245789

[99] SHEPPARD, O. a M. COLEMAN. Alzheimer’s Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. *Alzheimer’s Disease: Drug Discovery* [online]. Exon Publications, 2020, 1-22 [cit. 2023-08-04]. ISBN 9780645001709. Dostupné z: doi:10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch1

[100] HAMPEL, H., M. MESULAM, A. CUELLO et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* [online]. 2018, **141**(7), 1917-1933 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awy132

[101] BENTLEY, P., M. HUSAIN a R.J. DOLAN. Effects of Cholinergic Enhancement on Visual Stimulation, Spatial Attention, and Spatial Working Memory. *Neuron* [online]. 2004, **41**(6), 969-982 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1016/S0896-6273(04)00145-X

[102] BRACCO, L., V. BESSI, S. PADIGLIONI, S. MARINI a G. PEPEU. Do Cholinesterase Inhibitors Act Primarily on Attention Deficit? A Naturalistic Study in Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2014, **40**(3), 737-742 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-131154

[103] FERRIS, S., F. SCHMITT, J. SAXTON, S. RICHARDSON, J. MACKELL, Y. SUN a Y. XU. Analyzing the impact of 23 mg/day donepezil on language dysfunction in moderate to severe Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* [online]. 2011, **3**(3), 2-8 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1186/alzrt84

[104] THAL, L., J. FERGUSON, J. MINTZER, A. RASKIN a S. TARGUM. A 24-week randomized trial of controlled-release physostigmine in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* [online]. 1999, **52**(6), 1146-1146 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.52.6.1146

[105] SUMMERS, W., L. MAJOVSKI, G. MARSH, K. TACHIKI a A. KLING. Oral Tetrahydroaminoacridine in Long-Term Treatment of Senile Dementia, Alzheimer Type. *New England Journal of Medicine* [online]. 1986, **315**(20), 1241-1245 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM198611133152001

[106] KADIR, A., T. DARREH-SHORI, O. ALMKVIST et al. PET imaging of the in vivo brain acetylcholinesterase activity and nicotine binding in galantamine-treated patients with AD. *Neurobiology of Aging* [online]. 2008, **29**(8), 1204-1217 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.020

[107] BOHNEN, N., D. KAUFER, R. HENDRICKSON et al. Degree of inhibition of cortical acetylcholinesterase activity and cognitive effects by donepezil treatment in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [online]. 2005, **76**(3), 315 [cit. 2023-08-06].

[108] KUHL, D., S. MINOSHIMA, K. FREY, N. FOSTER, M. KILBOURN a R. KOEPPE. Limited donepezil inhibition of acetylcholinesterase measured with positron emission tomography in living Alzheimer cerebral cortex. *Ann Neurol* [online]. 2000, **48**(3), 391 [cit. 2023-08-06].

[109] KAASINEN, V., K. NåGREN, T. JÄRVENPÄÄ, A. ROIVAINEN, M. YU, V. OIKONEN, T. KURKI a J. RINNE. Regional Effects of Donepezil and Rivastigmine on Cortical Acetylcholinesterase Activity in Alzheimer's Disease. *Journal of Clinical Psychopharmacology* [online]. 2002, **22**(6), 615-620 [cit. 2023-08-06]. Dostupné z: doi:10.1097/00004714-200212000-00012

[110] GIACOBINI, E. Do Cholinesterase Inhibitors Have Disease-Modifying Effects in Alzheimer??s Disease?. *CNS Drugs* [online]. 2001, **15**(2), 85-91 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.2165/00023210-200115020-00001

[111] GREENAMYRE, J.T., W. MARAGOS, R. ALBIN, J. PENNEY a A. YOUNG. Glutamate transmission and toxicity in alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [online]. 1988, **12**(4), 421-424 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.1016/0278-5846(88)90102-9

[112] AREOSA, S., F. SHERRIFF a R. MCSHANE. Memantine for dementia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. 2005, **3**, 1-44 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD003154.pub3

[113] LONG, J. a D. HOLTZMAN. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* [online]. 2019, **179**(2), 312-339 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2019.09.001

[114] How Is Alzheimer's Disease Treated?. In: *NIH: National Institute on Aging* [online]. Rockville Pike, Maryland: U.S. Department of Health and Human Services, 2023 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: https://www.nia.nih.gov/health/how-alzheimers-disease-treated#behavioral

[115] KLEINOVÁ, L., J. CERMAN, J. HLÁVKA a J. HORT. New pharmacological options in the treatment of Alzheimer‘s disease. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2022, **85**(6) [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.48095/cccsnn2022462

[116] KOCIS, P., M. TOLAR, J. YU, W. SINKO, S. RAY, K. BLENNOW, H. FILLIT a J. HEY. Elucidating the Aβ42 Anti-Aggregation Mechanism of Action of Tramiprosate in Alzheimer’s Disease: Integrating Molecular Analytical Methods, Pharmacokinetic and Clinical Data. *CNS Drugs* [online]. 2017, **31**(6), 495-509 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.1007/s40263-017-0434-z

[117] WILCOCK, G., S. GAUTHIER, G. FRISONI et al. Potential of Low Dose Leuco-Methylthioninium Bis(Hydromethanesulphonate) (LMTM) Monotherapy for Treatment of Mild Alzheimer’s Disease: Cohort Analysis as Modified Primary Outcome in a Phase III Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2017, **61**(1), 435-457 [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-170560

[118] SAUNDERS, A., D. BURNS a W. GOTTSCHALK. Reassessment of Pioglitazone for Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2021, **15** [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2021.666958

[119] HOŠŤÁLKOVÁ, Anna. Studium obsahových látek vybraných taxonů z řádů Laurales a Ranunculales s potenciálně neuroprotektivní aktivitou. Hradec Králové, 2015. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

[120] DA SILVA MESQUITA, R., A. KYRYLCHUK, A. CHEREDNICHENKO, I. COSTA SÁ, L. MACEDO BASTOS, F. MOURA ARAÚJO DA SILVA, R. SARAIVA NUNOMURA a A. GRAFOV. In Vitro and In Silico Evaluation of Cholinesterase Inhibition by Alkaloids Obtained from Branches of *Abuta panurensis* Eichler. *Molecules* [online]. 2022, **27**(10) [cit. 2023-08-25]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27103138

[121] CHAUMONTET, M., M. CAPT a P. GOLD-AUBERT. Comparative study of two anti-ulcerogenic drugs--glaziovine and sulpiride. *Arzneimittelforschung* [online]. 1978, **28**(11), 2119-21 [cit. 2023-08-25]. PMID: 582915. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/582915/

[122] VECCHIETTI, V., C. CASAGRANDE a G. FERRARI. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. *Farmaco Sci.* [online]. 1977, **32**(11), 767-9 [cit. 2023-08-25]. PMID: 923790. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/923790/

[123] CHANG, F., J. WEI, C. TENG a Y. WU. Antiplatelet Aggregation Constituents from *Annona p urpurea*. *Journal of Natural Products* [online]. 1998, **61**(12), 1457-1461 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1021/np9800046

[124] LI, H., W. LI, H. WU a C. CHEN. Alkaloids from *Cinnamomum philippinense*. *Nat. Prod. Commun.* [online]. 2012, **7**(12), 1581-2 [cit. 2023-08-25]. PMID: 23413556. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23413556/

[125] CHENG, P., Y. MA, S. YAO et al. Two new alkaloids and active anti-hepatitis B virus constituents from *Hypserpa nitida*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2007, **17**(19), 5316-5320 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2007.08.027

[126] PYNE, M., N. GOLD a V.J.J. MARTIN. Pathway elucidation and microbial synthesis of proaporphine and bis-benzylisoquinoline alkaloids from sacred lotus (*Nelumbo nucifera*). *Metabolic Engineering* [online]. 2023, **77**, 162-173 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2023.03.010

[127] LEE, S. a H. YANG. Isoquinoline Alkaloids from *Neolitsea Konishii*. *Journal of the Chinese Chemical Society* [online]. 1992, **39**(2), 189-194 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1002/jccs.199200031

[128] ZHANG, M., G. LIANG, J. YU a W. PAN. Aporphine alkaloids from the roots of *Stephania viridiflavens*. *Natural Product Research* [online]. 2010, **24**(13), 1243-1247 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1080/14786410903125393

[129] DARY, C., S.S. BUN, G. HERBETTE et al. Chemical profiling of the tuber of *Stephania cambodica* Gagnep. (Menispermaceae) and analytical control by UHPLC-DAD. *Natural Product Research* [online]. 2017, **31**(7), 802-809 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2016.1247077

[130] ZUO, A., L. LI, Y. MA a G. RAO. Akaloids from roots of *Stephania dentifolia*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* [online]. 2013, **38**(4), 574-7 [cit. 2023-08-25]. PMID: 23713286. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23713286/

[131] BHAKUNI, D. a S. GUPTA. The Alkaloids of *Stephania glabra*. *Journal of Natural Products* [online]. 1982, **45**(4), 407-411 [cit. 2023-08-25]. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/np50022a007

[132] KASHIWABA, N., S. MOROOKA, M. ONO, J. TODA, H. SUZUKI a T. SANO. Alkaloidal Constituents of the Leaves of *Stephania cepharantha* Cultivated in Japan: Structure of Cephasugine, a New Morphinane Alkaloid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1997, **45**(3), 545-548 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.45.545

[133] HSIEH, T., C. CHEN, R. KUO, F. CHANG a Y. WU. Two New Alkaloids from *Artabotrys uncinatus*. *Journal of Natural Products* [online]. 1999, **62**(8), 1192-1193 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1021/np9900851

[134] MAJRASHI, T., F. ZULFIQAR, A. CHITTIBOYINA, Z. ALI a I. KHAN. Isoquinoline alkaloids from *Asimina triloba*. *Natural Product Research* [online]. 2019, **33**(19), 2823-2829 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2018.1504045

[135] ETSE, J., A. GRAY, D. THOMAS a P. WATERMAN. Terpenoid and alkaloid compounds from the seeds of *Monodora brevipes*. *Phytochemistry* [online]. 1989, **28**(9), 2489-2492 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(00)98011-7

[136] DA SILVA MESQUITA, R., A. KYRYLCHUK, R. COSTA DE OLIVEIRA et al. Alkaloids of Abuta panurensis Eichler: In silico and in vitro study of acetylcholinesterase inhibition, cytotoxic and immunomodulatory activities: In silico and in vitro study of acetylcholinesterase inhibition, cytotoxic and immunomodulatory activities. *PLoS One* [online]. 2020, **15**(9) [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0239364

[137] TALAPATRA, S., A. PATRA a B. TALAPATRA. Terpenoids and Related Compounds. Part XVII: Neutral Constituents of *Michelia lanuginosa* Wall. Structures, Absolute Configuration and Conformation of Three New Germacranolides. A Novel Rearrangement of Lanuginolide. *J. Indian Chem. Soc.* 1978, 1152-1154.

[138] PÉREZ, E., J. SÁEZ a B. CASSELS. A convenient, renewable source of the anxiolytic proaporphine alkaloid glaziovine: *Duguetia vallicola* leaves: DUGUETIA VALLICOLA LEAVES. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online]. 2005, **50**(3) [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.4067/S0717-97072005000300005

[139] TOMITA, M., M. KOZUKA a S. LU. Studies on the Alkaloids of Menispermaceous Plants. CCXXVIII: Alkaloids of *Pericampylus formosanus* DIELS. *YAKUGAKU ZASSHI* [online]. 1967, **87**(3), 315-316 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1248/yakushi1947.87.3_315

[140] OKAMOTO, Y., S. TANAKA, K. KITAYAMA, M. ISOMOTO, M. MASAISHI, H. YANAGAWA a J. KUNITOMO. Studies on the Alkaloids of *Menispermaceous* Plants. CCLXI. Alkaloids of *Menispermum dauricum* DC. (8). *YAKUGAKU ZASSHI* [online]. 1971, **91**(6), 684-687 [cit. 2023-08-25]. ISSN 0031-6903. Dostupné z: doi:10.1248/yakushi1947.91.6_684

[141] ARYA, A., R. CHAHAL, R. RAO et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. *Biomolecules* [online]. 2021, **11**(3) [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.3390/biom11030350

[142] CHEN, X., Z. YANG, X. LI, J. SUN, L. YANG a X. ZHANG. Colletotrichine B, a new sesquiterpenoid from Colletotrichum gloeosporioides GT-7, a fungal endophyte of *Uncaria rhynchophylla*. *Natural Product Research* [online]. 2019, **33**(1), 108-112 [cit. 2023-08-25]. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2018.1437437

[143] LUO, Q., W. CAO a Y. CHENG. Alkaloids, sesquiterpenoids and hybrids of terpenoid with p-hydroxycinnamic acid from *Ganoderma sinensis* and their biological evaluation. *Phytochemistry* [online]. 2022, **203** [cit. 2023-08-25]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2022.113379

[144] LI, J., F. LI, G. WU et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of sesquiterpenoids isolated from *Laggera pterodonta*. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2023, **14** [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2023.1074184

[145] FUJIWARA, M., N. YAGI a M. MIYAZAWA. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Volatile Oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (Yellow Batai) and Bisabolane-Type Sesquiterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(5), 2824-2829 [cit. 2023-08-25]. Dostupné z: doi:10.1021/jf9042387