

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY LÉČIV PŘÍRODNÍHO PŮVODU II.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jiří Janoušek, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2024

Nikola Kosinová

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL

BOTANY



DIPLOMA THESIS

**BIOLOGICAL ACTIVITY EVALUATION OF SUBSTANCES OF NATURAL
ORIGIN II.**

Head of diploma thesis: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Jiří Janoušek, Ph.D.

Hradec Králové, May 2024

Nikola Kosinová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně, pod vedením PharmDr. Marcely Šafratové, Ph.D. a PharmDr. Jiřího Janouška, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za odborné vedení a ochotu při zpracování teoretické části. Také bych chtěla poděkovat PharmDr. Jiřímu Janouškovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a čas strávený při experimentální práci v laboratoři.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 662.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
SEZNAM OBRÁZKŮ	5
SEZNAM TABULEK.....	5
1 ÚVOD	6
2 CÍLE PRÁCE.....	8
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1 Alkaloidy	9
3.1.1 Indolové alkaloidy.....	9
3.2 Čeleď Apocynaceae	11
3.2.1 Významné druhy čeledi Apocynaceae.....	11
3.2.2 Rod <i>Geissospermum</i> Allemão.....	12
3.3 Stanovení inhibiční aktivity cholinesteras	19
3.3.1 Role acetylcholinu, acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy v lidském organismu	19
3.3.2 Alzheimerova choroba.....	20
3.3.3 Přehled metod používaných ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras	22
3.4 Stanovení průchodu látek do mozku	26
3.4.1 Hematoencefalická bariéra	26
3.4.2 Mechanismy transportu látek přes hematoencefalickou bariéru	27
3.4.3 Stanovení přechodu látek přes hematoencefalickou bariéru	29
3.5 Metody ke stanovení buněčné viability	35
3.5.1 Dye exclusion metody	35
3.5.2 Kolorimetrické metody	36
3.5.3 Fluorimetrické metody	39
3.5.4 Luminometrické metody	40
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1 Testované alkaloidy	41
4.2 Biologická aktivita testovaných alkaloidů.....	42
4.2.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči rekombinantní humánní acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase	42
4.2.2 Test paralelního pronikání umělou membránou	43
4.2.3 Stanovení cytotoxicity za pomoci MTT testu s CHO-K1 a SH-SY5Y linií.....	47

5	VÝSLEDKY.....	50
5.1	Inhibiční aktivita látek vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase	50
5.2	Test paralelního pronikání umělou membránou	51
5.3	MTT test s CHO-K1 linií.....	53
5.4	MTT test s SH-SY5Y linií	54
6	DISKUSE A ZÁVĚR.....	55
7	POUŽITÁ LITERATURA	59
8	ABSTRAKT	67
9	ABSTRACT	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AChE	acetylcholinesterasa
AMK	aminokyselina
AMT	adsorpčně zprostředkovaná transcytóza (z angl. adsorptive-mediated transcytosis)
ATCh, ATChI	acetylthiocholin, acetylthiocholin jodid
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
AUC	plocha pod křivkou (z angl. area under curve)
BuChE	butyrylcholinesterasa
BUI	index vychytávání mozku (z angl. brain uptake index)
BuTCh, BuTChI	butyrylthiocholin, butyrylthiocholin jodid
Calcein-AM	calcein acetomethoxyester
CNS	centrální nervový systém
CVOs	cirkumventrikulární orgány (z angl. circumventricular organs)
CVS	barvení krystalovou violetí (z angl. crystal violet staining)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová)
FBS	fetální bovinní sérum
HEB	hematoencefalická bariéra
IC₅₀	střední inhibiční koncentrace (z angl. inhibition concentration)
LC/MS	kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrofotometrie (z angl. liquid chromatography/mass spectrometry)
LDH	laktátdehydrogenasa
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NVU	neurovaskulární jednotka (z angl. neurovascular unit)
PAMPA	paralelní test propustnosti umělé membrány (z angl. parallel artificial membrane permeability assay)
PBL	polární mozkový lipid (z angl. polar brain lipid)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffer saline)

PP	Pao pereira
PS	permeabilita povrchem plochy (z angl. permeability surface)
SEM	střední chyba průměru (z angl. standard error of the mean)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)
WST-1	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão (Global Biodiversity Information Facility, 2024)	13
Obrázek 2 Reakční schéma Ellmanovy metody (modifikované podle: Dingová et al., 2014)	24
Obrázek 3 Schematické znázornění složek tvořících NVU (HEB) (modifikované podle: Chen & Liu, 2012).....	27
Obrázek 4 Redukce MTT na formazan (modifikované podle: Kamiloglu et al., 2020)	37
Obrázek 5 96-ti jamková aparatura s donorovou a akceptorovou částí (modifikované podle: Ask et al., 2019).....	45
Obrázek 6 Kalibrační křivky a jejich rovnice linearity	51
Obrázek 7 Grafy závislosti koncentrace testovaných alkaloidů na viabilitě CHO-K1 linie buněk...	53
Obrázek 8 Grafy závislosti koncentrace testovaných alkaloidů na viabilitě SH-SY5Y linie buněk ..	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Základní strukturální typy indolových alkaloidů (Aniszewski, 2007)	10
Tabulka 2 Taxonomické zařazení čeledi Apocynaceae (Global Biodiversity Information Facility, 2024).....	11
Tabulka 3 Seznam vybraných izolovaných alkaloidů z <i>G. vellosii</i> (Camargo et al., 2013).....	13
Tabulka 4 Seznam izolovaných alkaloidů z <i>G. reticulatum</i> (Reina et al., 2012; Sajkowska-Kozielewicz et al., 2020)	15
Tabulka 5 Seznam izolovaných alkaloidů z <i>G. sericeum</i> (Steele et al., 2002; Bastos et al., 2023)..	16
Tabulka 6 Seznam izolovaných alkaloidů z <i>G. argenteum</i> (Camargo et al., 2013)	18
Tabulka 7 Farmakoterapie Alzheimerovy choroby (Anand & Singh, 2013; Scheltens et al., 2021)	21
Tabulka 8 Molekulová hmotnost a strukturální vzorce testovaných alkaloidů	41
Tabulka 9 Zjištěná vlnová délka testovaných látek pro měření absorbance	44
Tabulka 10 Procentuální hodnoty inhibiční aktivity testovaných alkaloidů vůči cholinesterasám	50
Tabulka 11 Koeficient permeability P_e a předpokládaný průnik testovaných látek přes HEB	52
Tabulka 12 Hodnoty IC_{50} testovaných alkaloidů (s buněčnou linií CHO-K1).....	53
Tabulka 13 Hodnoty IC_{50} testovaných alkaloidů (s buněčnou linií SH-SY5Y).....	54

1 ÚVOD

Lidé od nepaměti využívají léčiva přírodního původu k léčbě různých druhů onemocnění. V mnoha kulturách tvoří tradiční medicína založená na obsahových látkách léčivých rostlin základní pilíř péče o zdraví. Mezi produkty rostlinného metabolismu patří kromě primárních metabolitů také sekundární metabolity. Jednou z nejrozmanitějších skupin sekundárních metabolitů jsou alkaloidy. Právě alkaloidy jsou velmi významné z hlediska biologické aktivity a staly se tak předmětem mnoha studií. Alkaloidy poskytují širokou škálu biologických aktivit, mezi které patří např. anticholinergní, antimalarická, antipyretická, analgetická, protizánětlivá, antineoplastická, antibakteriální či centrálně stimulující aktivity a mnohé další (Debnath et al., 2018).

Cílem této diplomové práce bylo studium biologické aktivity testovaných alkaloidů izolovaných z rodu *Geissospermum* Allemão čeledi Apocynaceae, konkrétně z druhu *Geissospermum vellosii* Allemão. Jedná se o významný rod, vyskytující se na území Jižní Ameriky, a to zejména v oblastech Brazílie, Bolívie, Guyany a Venezuely. Tento rod je zdrojem především indolových alkaloidů, u kterých byla prokázána významná biologická aktivita. Za objevem rodu *Geissospermum* Allemão stojí doktor Francisco Freire Allemão, který tak učinil ve čtyřicátých letech 19. století. Od té doby bylo především z kůry stromů tohoto rodu izolováno mnoho alkaloidů, u kterých je zkoumána jejich biologická aktivita (zejména antimalarická, antineoplastická, anticholinesterasová a analgetická) (Camargo et al., 2013). V této diplomové práci se zaměřuji na studium anticholinesterasové aktivity testovaných alkaloidů, studium přechodu testovaných alkaloidů přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a stanovení jejich cytotoxicity. Testované alkaloidy byly izolovány v rámci diplomových prací na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Již v minulosti byly izolované alkaloidy z kůry stromu *G. vellosii* podrobeny studiu anticholinesterasové aktivity, a některé z nich se jeví jako velmi slibné molekuly (Lima et al., 2009; Lima et al., 2020). Významná anticholinesterasová aktivita testovaných alkaloidů představuje slibný zdroj pro vývoj nových léčiv k léčbě Alzheimerovy choroby. Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které postihuje centrální nervovou soustavu (CNS). Tato choroba je považována za celosvětový zdravotní problém. V současné době se k terapii této choroby využívají především inhibitory cholinesteras, jejichž mechanismus spočívá v blokaci enzymů, které odbourávají acetylcholin (ACh), čímž dochází

ke zvýšení hladiny ACh v CNS a zmírnění příznaků onemocnění. Inhibitory cholinesteras společně s antagonisty N-methyl-D-aspartátového receptoru cílí na zlepšení kognitivních funkcí pacientů, nicméně nezabraňují progresi tohoto onemocnění. Vzhledem k limitovaným možnostem stávající léčby a jejich nežádoucím účinkům je snaha o vývoj inovativních léčiv stále aktuální (Breijyeh & Karaman, 2020).

2 CÍLE PRÁCE

- Navázání na předešlé diplomové práce, v rámci kterých byly izolovány alkaloidy.
- Vypracování literární rešerše se zaměřením na fytochemicky zpracované druhy rodu *Geissospermum* Allemão.
- Vypracování literární rešerše se zaměřením na porovnání metod, které se uplatňují při hodnocení inhibiční aktivity cholinesteras, hodnocení přechodu látek přes hematoencefalickou bariéru a hodnocení buněčné viability.
- Stanovení biologické aktivity testovaných alkaloidů, konkrétně stanovení inhibiční aktivity vůči rekombinantní humánní acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase s použitím Ellmanovy metody. Stanovení přechodu testovaných alkaloidů přes hematoencefalickou bariéru pomocí testu paralelního pronikání umělou membránou. Stanovení buněčné viability s použitím metody MTT.
- Zpracování a vyhodnocení výsledků.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alkaloidy

Alkaloidy se řadí mezi významné sekundární metabolity, které jsou produkovány zejména vyššími rostlinami, ale i nižšími houbami, bakteriemi nebo např. obojživelníky. Alkaloidy jsou charakterizovány jako heterocyklické sloučeniny odvozené především od aminokyselin (AMK). Jedná se o organické dusíkaté báze, které ve své struktuře obsahují alespoň 1 atom dusíku. Většina alkaloidů se jeví jako pevné bezbarvé látky, které vykazují lipofilní charakter a špatnou rozpustnost ve vodě. Pokud se vyskytují ve formě solí, jsou naopak velmi dobře rozpustné ve vodě. Často obsahují jedno nebo více chirálních center, jedná se tedy o opticky aktivní látky. Stavebními kameny většiny alkaloidů jsou AMK, jako je např. lysin, ornitin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan a další. Mezi alkaloidy najdeme i ty, které vznikají z kyseliny nikotinové (nepatří mezi AMK). Struktura některých alkaloidů může být založena i na terpenoidním nebo např. steroidním skeletu. Právě alkaloidy, na rozdíl od protoalkaloidů a pseudoalkaloidů, obsahují dusík integrovaný do struktury heterocyklu, který pochází z prekurzorové AMK. Protoalkaloidy obsahují uhlovodíkovou část prekurzorové AMK a dusík mají zabudovaný mimo heterocyklus. Ačkoliv u pseudoalkaloidů dusík v jejich struktuře pochází z AMK, zbylé části jsou produkty odlišných biosyntetických drah. Dle strukturního typu lze alkaloidy dělit na chinolinové, isochinolinové, tropanové, indolové a mnohé další. Alkaloidy jsou významné z hlediska biologické aktivity a často se jejich účinků využívá v praxi (Aniszewski, 2007).

3.1.1 Indolové alkaloidy

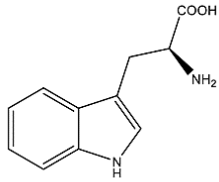
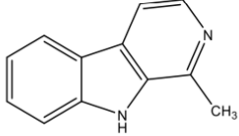
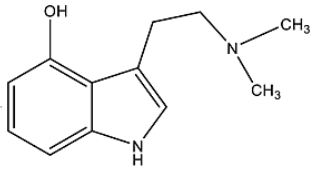
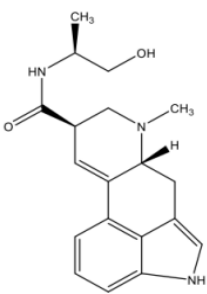
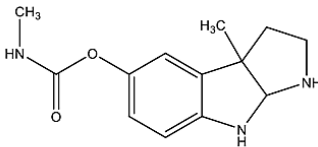
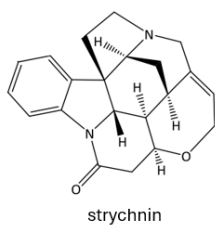
Základem indolových alkaloidů je indolové jádro, které je tvořeno bicyklickou strukturou skládající se z pyrrolu a benzenového jádra. Z rostlinných materiálů bylo izolováno velké množství sloučenin s indolovou strukturou. Byly prozkoumány jejich farmakologické vlastnosti a zjistilo se, že indolové alkaloidy se vyznačují silnou biologickou aktivitou. Mezi významné terapeutické vlastnosti indolových alkaloidů patří protirakovinná, antibakteriální, antivirová, antimalarická a protizánětlivá aktivita a mnohé další. Indolové alkaloidy se vyskytují v rostlinách z čeledí Apocynaceae, Loganiaceae nebo např. Rubiaceae (Omar et al., 2021).

3.1.1.1 Základní strukturní typy indolových alkaloidů

Indolové alkaloidy jsou odvozeny od AMK tryptofanu a jeho dekarboxylačního produktu tryptaminu. Indolové alkaloidy lze klasifikovat na jednoduché a složené. Mezi jednoduché

indolové alkaloidy se řadí psilocybinový typ a fysostigminový typ. Zástupci psilocybinového typu jsou látky psilocin a psilocybin, halucinogenní alkaloidy z rodu *Psilocybe* nebo např. *Conocybe*. Alkaloidem fysostigminového typu je fysostigmin, nacházející se v semenech rostliny *Physostigma venenosum* Balf. (Fabaceae), který je typický svojí anticholinesterasovou aktivitou. Mezi složené indolové alkaloidy patří β -karbolinové alkaloidy, jejichž zástupci jsou např. harman, harmin a harmalin (*Peganum harmala* L., Nitrariaceae). Mezi složené indolové alkaloidy patří dále ergolinový typ, ke kterému se řadí námelové alkaloidy (ergotamin, ergometrin, rod *Claviceps*). Dalším strukturním typem indolových alkaloidů je strychninový typ, do kterého patří jedovaté alkaloidy strychnin a brucin, pocházející ze semen *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae) (Aniszewski, 2007). V Tabulce 1 je uveden přehled vybraných indolových alkaloidů jednotlivých strukturních typů.

Tabulka 1 Základní strukturní typy indolových alkaloidů (Aniszewski, 2007)

Strukturní typy	Chemická struktura	Strukturní typy	Chemická struktura
Prekurzorová AMK L-tryptofan	 L-tryptofan	β -karbolinový typ	 harman
Psilocybinový typ (indolalkylaminový typ)	 psilocin	Ergolinový typ	 ergometrin
Fysostigminový typ	 fysostigmin	Strychninový typ	 strychnin

3.2 Čeleď Apocynaceae

Čeleď Apocynaceae (toješťovité) představuje velmi různorodou čeleď krytosemenných rostlin. Do této čeledi řadíme sukulenty, byliny, ale i stromy, polokeře, keře a liány. Vyskytují se po celém světě, s dominancí stromů a lián ve vlhkých tropech a subtropích, sukulenty se nacházejí převážně v sušších oblastech. Čeleď Apocynaceae je velmi významná díky bohatému obsahu alkaloidů s celou řadou farmakologických aktivit. Mimo jiné je také zdrojem dalších obsahových látek jako jsou např. terpenoidy, flavonoidy, glykosidy či fenoly. Alkaloidy z čeledi Apocynaceae vykazují široké spektrum biologických aktivit zejména díky svým antioxidačním, protizánětlivým, antimikrobiálním a cytotoxickým účinkům. Některé druhy se pěstují také jako okrasné rostliny (Bhadane et al., 2018). Tabulka 2 shrnuje taxonomické zařazení čeledi Apocynaceae.

Tabulka 2 Taxonomické zařazení čeledi Apocynaceae (Global Biodiversity Information Facility, 2024)

	Latinsky	Česky
Říše	Plantae	Rostliny
Podříše	Streptophyta	Streptofyty
Oddělení	Tracheophyta	Cévnaté
Pododdělení	Spermatophytina	Semenné
Pododdělení	Angiospermae	Krytosemenné
Třída	Magnoliopsida	Dvouděložné
Řád	Gentianales	Hořcotvaré
Čeleď	Apocynaceae	Toješťovité

3.2.1 Významné druhy čeledi Apocynaceae

Mezi významné druhy čeledi Apocynaceae z hlediska biologické aktivity obsahových látek jsou řazeny např. *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth ex Kurz., *Alstonia scholaris* (L.) R.Br. a další. Obsahové látky vinblastin a vinkristin, druhu *Catharanthus roseus* (barvínkovec růžový), jsou velmi důležité z hlediska antineoplastické aktivity. Vinblastin a vinkristin fungují na principu inhibice mitózy. Váží se na buněčné mikrotubuly (konkrétně tubulin) a znemožňují tak jejich funkci. V praxi se používají při léčbě různých typů rakoviny jako je např. dětská akutní lymfoblastická leukémie, Hodgkinova choroba

či rakovina prsu. Další významnou obsahovou látkou je reserpin, který je získáván z kořene *Rauwolfia serpentina* (zmijovice hadová) a *Rauwolfia vomitoria* (zmijovice dávivá). Reserpin je známý pro svoje antipsychotické a antihypertenzní účinky. Africký keř *Tabernanthe iboga* (iboga) je zdrojem alkaloidů ibogainu a coronaridinu. Ibogain je psychoaktivní indolový alkaloid, který může být izolován z kůry a kořene *Tabernanthe iboga*. V současnosti neexistuje žádné schválené lékařské použití ibogainu. Coronaridin, izolovaný z kůry, kořene a listů *Tabernanthe iboga*, vykazuje antihypertenzní a anticholinesterasovou aktivitu. Indolový alkaloid voacangin, izolovaný z listu, kořene a kůry *Tabernaemontana catharinensis*, je zajímavý z hlediska antioxidační, anticholinesterasové a expresivní protinádorové aktivity (Aniszewski, 2007; Debnath et al., 2018).

3.2.2 Rod *Geissospermum* Allemão

Rod *Geissospermum* Allemão byl objeven zhruba v polovině 19. století a je řazen do čeledi Apocynaceae. Za objevem tohoto rodu stojí doktor Francisco Freire Allemão. Zástupci rodu *Geissospermum* Allemão jsou stromy, které se vyskytují především na území Jižní Ameriky. V oblasti tradiční medicíny hrají obsahové látky izolované z rodu *Geissospermum* Allemão důležitou roli. Již po mnoho let jsou využívány k léčbě malárie, nádorů, bakteriálních infekcí a bolesti. Do rodu *Geissospermum* Allemão je řazeno celkem 12 druhů, z toho ale pouze 6 druhů bylo fytochemicky analyzováno (*G. argenteum*, *G. fuscum*, *G. vellosii*, *G. reticulatum*, *G. sericeum* a *G. urceolatum*) (Sajkowska-Kozielewicz et al., 2020).

3.2.2.1 *Geissospermum vellosii* Allemão

Druh *Geissospermum vellosii* Allemão (synonymum *G. laeve* Miers) (Apocynaceae) je strom (Obrázek 1), vyskytující se na území Jižní Ameriky, a to konkrétně na území Brazílie až Guyany. Jedná se o nejvýznamnější druh rodu *Geissospermum* Allemão, který je také známý pod názvem Pao pereira (PP). Kůra *G. vellosii* je zdrojem indolových alkaloidů, u kterých byla zjištěna významná biologická aktivita. Tradičně se kůra tohoto stromu využívá pro svoje účinky proti bolesti, trávícím obtížím, malárii a mnoha dalším onemocněním. V klinické praxi se využívají extrakty z tohoto druhu k léčbě onemocnění jako je rakovina prostaty či HIV/AIDS (flavopereirin). Některé izolované alkaloidy jeví aktivitu a potenciální využití v oblasti léčby Alzheimerovy choroby. Z kůry stromu *G. vellosii* bylo doposud izolováno 15 alkaloidů, první již v roce 1877 (Camargo et al., 2013). Seznam vybraných izolovaných alkaloidů je uveden v Tabulce 3.



Obrázek 1 *Geissospermum vellosii* Allemão (Global Biodiversity Information Facility, 2024)

Tabulka 3 Seznam vybraných izolovaných alkaloidů z *G. vellosii* (Camargo et al., 2013)

Rod	Izolované alkaloidy
<i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	12-methoxy-1-methylaspidospermidin
	apogeissoschizin
	flavopereirin
	geissolosimin
	geissoschizin
	geissoschizolin
	geissoschizon
	geissospermin
	geissovelin
	pausperadin
	pereirin
	vellosimin
	vellosiminol

Lima et al. (2009) se ve svém výzkumu zabývali *in vivo* a *in vitro* hodnocením anticholinesterasové aktivity alkaloidního extraktu a izolovaných alkaloidů z kůry *G. vellosii*. Stanovení inhibiční aktivity bylo měřeno vůči enzymům získaných z různých druhů zvířat. Významnou inhibiční aktivitu vykazovala frakce 1 při pH 7 vůči acetylcholinesterase (AChE) i butyrylcholinesterase (BuChE) v závislosti na koncentraci. Testování *in vivo* bylo zaměřeno

na zkoumání vlivu frakce 1 na kognitivní funkce a prostorovou paměť myši, které byly nejprve utlumeny použitím skopolaminu. Test ukázal, že frakce 1 zlepšila chování a učení myši, čímž potlačila účinek skopolaminu. Z hlediska prostorové paměti po podané frakci 1 došlo také k výraznému zlepšení. V závěru studie byla potvrzena silná inhibiční aktivita při testování *in vitro* vůči AChE a BuChE s mírnou selektivitou vůči BuChE. *In vivo* testy potvrdily zlepšení kognitivních funkcí. Studie prokázala, že hlavním inhibitorem cholinesterasy v PP je geissospermin (Lima et al., 2009). V novější studii z roku 2020 se Lima et al. zabývali izolací 4 indolových alkaloidů z *G. vellosii*, jednalo se o geissoschizolin, geissoschizon, geissospermin a 3',4',5',6'-tetrahydrogeissospermin. Cílem studie bylo hodnocení anticholinesterasové aktivity s využitím modifikované Ellmanovy metody a stanovení buněčné cytotoxicity MTT testem *in vitro*. Na základě výsledků vykazovaly všechny testované alkaloidy inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE, s výjimkou geissosperminu, který inhiboval pouze BuChE. Z hlediska testované cytotoxicity byl bezpečný pouze geissoschizolin, který na základě zjištěných výsledků představuje velmi slibnou molekulu (Lima et al., 2020).

Předmětem zkoumání se stala také potenciální antinociceptivní a protizánětlivá aktivita kmenové kůry *G. vellosii*. Testování probíhalo s klasickým myším modelem zánětu a bolesti. Hodnocená byla frakce a ethanolový extrakt kůry *G. vellosii*. Bolest a zánětlivá reakce byly vyvolány chemickými činidly (kyselina octová, formaldehyd, karagenan). Výsledkem testování bylo potlačení abdominálních křečí a snížení zánětu, a tedy potvrzení protizánětlivé a antinociceptivní aktivity u testované frakce *in vivo*. Ze studie také vyplývá, že mechanismus působení testovaných látek pravděpodobně nesouvisí s opioidním systémem, ale s anticholinesterasovou aktivitou (Lima et al., 2016).

Indolové alkaloidy z kůry *G. vellosii* byly podrobeny také testování z hlediska antineoplastické aktivity. Li et al. (2019) zkoumali funkční mechanismus a terapeutický potenciál β -karbolinového alkaloidu flavopereirinu pro léčbu kolorektálního karcinomu. Testování bylo provedeno na buněčných liniích kolorektálního karcinomu *in vitro* a *in vivo*. Výsledky studie ukázaly, že flavopereirin snižuje viabilitu některých buněčných linií kolorektálního karcinomu, dále podporuje zástavu buněčného cyklu G2/M fáze a podporuje vnitřní a vnější apoptózu testovaných buněk kolorektálního karcinomu (Li et al., 2019). Antineoplastickou aktivitu extraktu z kůry *G. vellosii* potvrzuje také studie zabývající se účinky tohoto extraktu na karcinom prostaty (Bemis et al., 2009). Další studie z roku 2013 zaměřená na testování antineoplastické aktivity izolovaných alkaloidů *G. vellosii* uvádí, že použitý extrakt

z kůry prokázal silnou protirakovinnou aktivitu na buňky karcinomu vaječníků. Zároveň také bylo prokázáno zesílení účinků karboplatiny s použitím tohoto extraktu (Yu & Chen, 2013).

V rámci hodnocení biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *G. vellosii* byla hodnocena také antibakteriální a antimalarická aktivita. Kůra stromu *G. vellosii* byla používána tradičně obyvateli oblastí Jižní Ameriky k léčbě malárie. Hodnocením antiplazmodiální aktivity se zabývali např. Mbeunkui et al. (2012). Studie porovnává aktivitu sumárního extraktu a izolovaných alkaloidů geissolosiminu, geissosperminu, geissoschizolinu a geissoschizonu vůči původci malárie *Plasmodium falciparum* senzitivnímu na chlorochin. Nejvyšší antimalarickou aktivitu vykazoval geissolosimin, který se jeví jako potenciální látka pro vývoj antimalarika (Mbeunkui et al., 2012).

3.2.2.2 *Geissospermum reticulatum* AH Gentry

Druh *Geissospermum reticulatum* AH Gentry (Apocynaceae) je strom, který je rozšířený na území Jižní Ameriky, a to ve Venezuele, Peru, Brazílii a Bolívii (Camargo et al., 2013). *G. reticulatum* je zdrojem indolových alkaloidů, které se vyznačují zejména antimalarickou, protinádorovou, antioxidační, analgetickou a antibakteriální aktivitou. Výzkumný tým izoloval z kůry a listů stromu *G. reticulatum* 10 alkaloidů s potenciální biologickou aktivitou (Reina et al., 2012). Na základě výzkumu Sajkowska-Kozielewicz et al. (2020) byl charakterizován nový alkaloid (geissospermiculatin) pocházející z kůry stromu *G. reticulatum*. Geissospermiculatin byl podroben hodnocení cytotoxicity *in vitro* na maligních buňkách THP-1 (Sajkowska-Kozielewicz et al., 2020). Přehled izolovaných alkaloidů stromu *G. reticulatum* je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4 Seznam izolovaných alkaloidů z *G. reticulatum* (Reina et al., 2012; Sajkowska-Kozielewicz et al., 2020)

Rod	Izolované alkaloidy	Izolované alkaloidy
<i>Geissospermum reticulatum</i> AH Gentry	(E)-10-demethoxy-12-hydroxygeissovellin	N-deacetyl-N-butanoylgeissospermidin
	(Z)-10-demethoxy-12-hydroxygeissovellin	geissospermiculatin
	10-demethoxy-12-hydroxy-17,19-epoxygeissovellin	geissosreticulatin
	10-methoxygeissospermidin	geissospermidin
	11-methoxygeissospermidin	O-demethylaspidospermin
	flavopereirin	–

Vědecký výzkum vedený Reina et al. (2012) zkoumal biologickou aktivitu izolovaných alkaloidů z *G. reticulatum*. Extrakty z listů a kůry prokázaly antiparazitickou aktivitu vůči *Leishmania infantum* a *Trypanosoma cruzi*, což jsou původci Chagasovy nemoci a leishmaniózy. V rámci výzkumu byla zkoumána také cytotoxicita izolovaných alkaloidů na savčích buňkách (ovariální buňky křečička čínského), kde viabilita buněk byla analyzována kolorimetrickou metodou MTT. Výsledky studie ukazují, že některé alkaloidy izolované z listů stromu (*O*-demethylaspidospermin, *N*-deacetyl-*N*-butanoylgeissospermidin) vykazují antiparazitickou aktivitu vůči již zmíněným původcům. *O*-demethylaspidospermin jevil vysokou aktivitu vůči *L. infantum* a menší aktivitu vůči *T. cruzi*. V rámci testování cytotoxicity u tohoto alkaloidu byla zjištěna pouze nízká cytotoxicita v porovnání s referenčními sloučeninami nifurtimoxem a amfotericinem B. Alkaloid *N*-deacetyl-*N*-butanoylgeissospermidin vykazoval aktivitu pouze vůči *L. infantum*. Z důvodu zjištěných nežádoucích účinků je nezbytné dále zkoumat danou problematiku v rámci navazujících studií (Reina et al., 2012).

Sajkowska-Kozielewicz et al. (2020) zkoumali nově izolovaný indolový alkaloid geissospermiculatin z hlediska cytotoxicity *in vitro* na maligních buňkách THP-1. Experiment potvrdil, že testovaný alkaloid vykazuje cytotoxicitu vůči maligním buňkám, zatímco nízkou cytotoxicitu vůči nemaligním buňkám. Z toho vyplývá, že geissospermiculatin se jeví slibně pro další testování (Sajkowska-Kozielewicz et al., 2020).

3.2.2.3 *Geissospermum sericeum* Benth. et Hook.f. ex Miers

Druh *Geissospermum sericeum* Benth. et Hook.f. ex Miers (Apocynaceae) je strom, který se vyskytuje na území Jižní Ameriky, a to zejména v Guyaně a Brazílii (Camargo et al., 2013). Z kůry tohoto stromu byly izolovány indolové alkaloidy (Tabulka 5), u kterých byla testována biologická aktivita (Steele et al., 2002).

Tabulka 5 Seznam izolovaných alkaloidů z *G. sericeum* (Steele et al., 2002; Bastos et al., 2023)

Rod	Izolované alkaloidy
<i>Geissospermum sericeum</i> Benth. et Hook.f. ex Miers	1,2-dehydrogeissoschizolin
	flavopereirin
	geissoschizolin
	geissoschizolin N ⁴ -methylchlor
	geissoschizolin N ⁴ -oxid

Steele et al. (2002) se ve svém výzkumu zabývali hodnocením antiplazmodiální aktivity vůči původci *Plasmodium falciparum* rezistentnímu na chlorochin (K1) a chlorochin-senzitivnímu (T9-96). Testování byly podrobeny extrakty z kůry *G. sericeum*. Zároveň byla hodnocena cytotoxicita izolovaných alkaloidů na lidské buněčné linii (KB), která byla hodnocena pomocí modifikovaného MTT testu. Výsledky studie uvádějí, že nejvyšší antiplazmodiální aktivitu proti kmenům K1 a T9-96 *P. falciparum* vykazoval β -karbolinový alkaloid flavopereirin. Nicméně žádný z testovaných alkaloidů nejevil vyšší antiplazmodiální aktivitu než chlorochin (pozitivní kontrola). *In vitro* studie prokázala, že extrakty a alkaloidy z *G. sericeum* působí proti *P. falciparum*, což potvrzuje historické využití této rostliny v boji proti malárii (Steele et al., 2002).

Bastos et al. (2023) zkoumali vliv izolovaných alkaloidů z *G. sericeum* na buněčnou linii ACP02 (lidský adenokarcinom žaludku). Testování byl podroben flavopereirin, dihydroflavopereirin a PB-100 (směs flavopereirinu a dihydroflavopereirinu). Mimo jiné byl také v této studii popsán postup získání nového alkaloidu (geissoschizolin N⁴-methylchlor). Cytotoxicita alkaloidů byla hodnocena na základě MTT testu s použitím buněčných linií hepatocelulárního karcinomu (HepG2) a ledvinových buněk africké opice *Cercopithecus aethiops* (VERO). Ze studie vyplývá, že geissoschizolin N⁴-methylchlor a alkaloidní frakce inhibovaly kaspasy 3 a 8, což jsou enzymy důležité pro apoptózu (buněčnou smrt). Alkaloidní frakce byla účinnější než geissoschizolin N⁴-methylchlor v inhibici růstu rakovinných buněk, ale zároveň geissoschizolin N⁴-methylchlor byl méně toxický pro zdravé buňky než alkaloidní frakce. Alkaloid geissoschizolin N⁴-methylchlor se jeví slibně z hlediska selektivní cytotoxicity v žaludečních nádorových buňkách, nicméně je zapotřebí dalších ověřovacích studií (Bastos et al., 2023).

3.2.2.4 *Geissospermum argenteum* Woodson

Druh *Geissospermum argenteum* Woodson (Apocynaceae) je strom, který je rozšířený na území Jižní Ameriky, a to především v oblastech Guyany a Brazílie až Venezuely. Tento strom je známý pod lidovým názvem quinarana-da-fruta-pequena. V roce 1978 byla zkoumána kůra a listy tohoto stromu a došlo k úspěšné izolaci alkaloidů z tohoto druhu. Podařilo se izolovat celkem 4 alkaloidy (Tabulka 6) (Camargo et al., 2013).

Tabulka 6 Seznam izolovaných alkaloidů z *G. argenteum* (Camargo et al., 2013)

Rod	Izolované alkaloidy
<i>Geissospermum argenteum</i> Woodson	(-)-aspidospermin
	(+)-aspidospermin
	(-)-demethylaspidospermin
	(+)-demethylaspidospermin

Correia et al. (2008) se věnovali výzkumu antimikrobiální aktivity u rostlin z oblasti brazilského amazonského deštného lesa. Předmětem zkoumání byly i ethanolové extrakty získané z *G. argenteum*. Antimikrobiální aktivita byla testována vůči bakteriím z kolekce ATCC (z angl. American Type Culture Collection) a vůči kmenům rezistentním na více léčiv, které byly získány z nemocniční sbírky. Testovaný extrakt z *G. argenteum* vykazoval významnou inhibiční aktivitu proti bakteriálním kmenům, a to *Pseudomonas aeruginosa* a metilicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (Correia et al., 2008). V novější studii z roku 2011 byla opět zkoumána antimikrobiální aktivita extraktů a frakcí *G. argenteum*. Byl zkoumán vodní extrakt z listů a ethanolový extrakt z kůry, které vykazovaly antimikrobiální aktivitu vůči bakteriálnímu kmeni *S. aureus*. Zkoumáním byla také prokázána inhibiční aktivita proti bakteriálnímu kmeni *S. mutans*, a to u methanolového extraktu z kůry a jeho hexanové frakce (Camargo et al., 2013).

3.2.2.5 *Geissospermum urceolatum* AH Gentry

Druh *Geissospermum urceolatum* AH Gentry je strom z čeledi Apocynaceae, který je rozšířený na území Jižní Ameriky, a to hlavně v Brazílii. Kůra stromu se používá zejména v lidovém léčitelství tamními obyvateli k léčbě malárie a horečky. Dostupnost informací o tomto druhu je doposud značně omezená (Camargo et al., 2013).

3.3 Stanovení inhibiční aktivity cholinesteras

3.3.1 Role acetylcholinu, acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy v lidském organismu

ACh je neurotransmiterem periferní nervové soustavy (PNS) a CNS. Neurotransmitery jsou nezbytné pro fungování nervového systému, jelikož zprostředkovávají přenos informací. ACh je uvolňovaný z neuronů na základě depolarizace buněčné membrány a po uvolnění umožňuje komunikaci mezi nervovými buňkami a dalšími specializovanými buňkami (myocyty, žlázovými buňkami) (Świt et al., 2023). ACh je syntetizován v nervových zakončeních působením enzymu cholinacetyltransferasy, která katalyzuje reakci mezi cholinem a koenzymem acetyl-CoA za vzniku nové molekuly ACh. V axonovém zakončení se nově syntetizovaný ACh shromažďuje ve vezikulách a jen malá část se volně nachází v cytosolu. Uvolnění vezikul s ACh do synaptické štěrbiny nastává po přenesení akčního potenciálu, který dosáhne konce axonu. Poté již zmíněná depolarizace způsobuje otevření napětově řízených kalciových kanálů a uvolnění vezikul. Když ACh dosáhne synaptické štěrbiny, může se vázat na ACh receptory, konkrétně muskarinové a nikotinové receptory (Čolović et al., 2013).

Ukončení působení ACh je způsobeno přítomností cholinesteras (enzymů), které katalyzují štěpení ACh na cholin a acetát. Jedním z nejdůležitějších enzymů je AChE, označovaná také jako specifická esterasa, která je rozšířená v CNS i PNS. AChE patří do skupiny serinových hydrolas a svým působením hydrolyzuje výhradně ACh na postsynaptické membráně zejména nervosvalových spojení a cholinergních mozkových synapsí. Mimo jiné se AChE nachází také v tkáních jako je membrána červených krvinek, kde není role enzymu zcela objasněna. Hlavní fyziologickou úlohou AChE je hydrolýza ACh, a tedy ukončení nervového přenosu na cholinergních receptorech. Enzym BuChE, označovaný také jako pseudocholinesterasa či plazmatická cholinesterasa, patří mezi serinové hydrolasy stejně jako AChE. Přítomnost BuChE je rozšířena na celý organismus, zejména na krevní sérum, játra, slinivku břišní a CNS (Mushtaq et al., 2014; Chatonnet & Lockridge, 1989). Fyziologická funkce BuChE nebyla dosud objasněna, nicméně bylo zjištěno, že BuChE se podílí na hydrolýze cholinových esterů, ale také látek jako jsou prokain, kokain, bupivakain či suxamethonium. Testováno bylo také exogenní podání BuChE jako antidota při otravě organofosfáty (Patočka et al., 2004).

Oba enzymy AChE i BuChE mohou být inhibovány řadou přírodních a syntetických látek. Mezi ireverzibilní inhibitory AChE a BuChE se řadí např. organofosforové inhibitory. Příkladem takových látek je sarin, soman a tabun, které prochází přes HEB a byly zneužívány pro své nervově paralytické účinky (Pohanka, 2014). Mezi organofosforové inhibitory se řadí také látky používané jako pesticidy (např. chlorpyrifos, fosmet, fenitrothion a další). Jedná se o látky, které mají různé stupně toxicity, a to vůči rostlinám, hmyzu, zvířatům, ale i lidem. Akutní otrava organofosfáty u člověka způsobuje počáteční příznaky jako je nevolnost, závratě, zvracení či průjem. V pozdější fázi otravy se dostávají příznaky jako je svalový třes, křeče a těžká otrava organofosfáty vede až ke smrti (Kaushal et al., 2021).

Důležitými inhibitory cholinesteras používanými v praxi k léčbě Alzheimerovy choroby jsou galanthamin, donepezil a rivastigmin. Alkaloid galanthamin je reverzibilní, selektivní, kompetitivní inhibitor AChE. Donepezil je reverzibilní, selektivní, nekompetitivní inhibitor AChE. Rivastigmin je pseudoireverzibilní inhibitor AChE i BuChE. Jedná se o látky, které působí na centrální úrovni a svým působením ovlivňují kognitivní funkce a zpomalují progresi Alzheimerovy choroby (Pohanka, 2014).

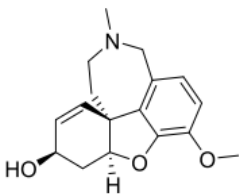
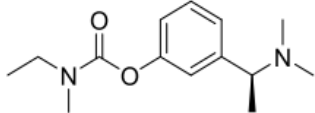
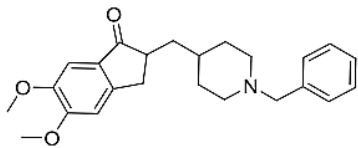
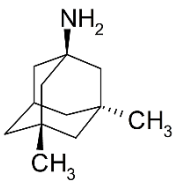
3.3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které postihuje CNS. Jedná se o nejčastější příčinu demence, která se projevuje zhoršením kognitivních funkcí a ztrátou soběstačnosti v běžných denních činnostech. Charakteristickým znakem onemocnění je tvorba neuritických plaků a neurofibrilárních klubek vlivem akumulace amyloid-beta peptidu. Tato choroba je považována za multifaktoriální onemocnění, ačkoli základní příčina vzniku choroby je doposud neznámá. S rozvojem onemocnění souvisí abnormální akumulace β -amyloidu v mozku, která vede k tvorbě plaků a neurodegeneraci. V důsledku progresu onemocnění dochází také k úbytku ACh, neurotransmiteru, který je důležitý pro paměť a učení. Existuje také řada rizikových faktorů pro vznik onemocnění, mezi které patří zvyšující se věk, genetické faktory, poranění hlavy, cévní onemocnění či infekce a mnohé další. Vývoj onemocnění lze rozdělit do několika fází. První fází je preklinické (presymptomatické) stádium, které může trvat v řádu několika let. V první fázi onemocnění zatím nedochází k zasažení do každodenních aktivit, dochází však k časným patologickým změnám v kůře mozku a hipokampu. Může se objevit lehké snížení paměti. Následuje stádium mírné (rané), v tomto případě již pacienti pociťují zasažení do běžných denních aktivit. Hlavními projevy jsou ztráta

koncentrace a paměti nebo také dezorientace v rámci místa a času. Choroba se postupně rozvíjí ve stádium střední, ve kterém dochází k silnějšímu zasažení paměti vlivem rozšíření onemocnění do oblastí mozkové kůry. Následkem jsou potíže se psaním, čtením, řečí a může nastat také problém s rozpoznáním přátel a rodiny. Poslední je stádium pozdní (těžké), v takovém případě je onemocnění rozšířeno do celé oblasti kůry a pacienti jsou v této fázi často upoutáni na lůžko. Vlivem rozvíjejících se komplikací pacienti s Alzheimerovou chorobou umírají (Breijyeh & Karaman, 2020).

Jako první volba při farmakoterapii Alzheimerovy choroby se používá kognitivní farmakoterapie. Porucha kognitivních funkcí zahrnuje např. poruchu paměti a učení, poruchu orientace, úsudku či exekutivních funkcí jako je plánování nebo organizování. Při terapii kognitivních funkcí jsou schváleny léčiva ze skupiny inhibitorů cholinesteras (donepezil, rivastigmin, galanthamin) a dále nekompetitivní antagonist N-methyl-D-aspartátového receptoru (memantin) (chemické struktury uvedené v Tabulce 7). Inhibitory cholinesterasy jsou látky, u kterých je podmínkou působení přechod přes HEB do mozku. Princip působení inhibitorů cholinesteras spočívá v blokaci enzymů, které odbourávají ACh, čímž dochází ke zvýšení hladiny ACh v CNS a zmírnění příznaků onemocnění (Scheltens et al., 2021).

Tabulka 7 Farmakoterapie Alzheimerovy choroby (Anand & Singh, 2013; Scheltens et al., 2021)

Farmakoterapie Alzheimerovy choroby	Chemická struktura	Farmakoterapie Alzheimerovy choroby	Chemická struktura
Galanthamin		Rivastigmin	
Donepezil		Memantin	

3.3.3 Přehled metod používaných ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras

Ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras bylo navrženo mnoho metod, které často vychází z kvantifikace vzniklého produktu či nezreagovaného substrátu dané reakce. Z hlediska použitého substrátu můžeme metody rozdělit na ty, které využívají jako substrát přirozený ACh a ty, které využívají syntetický substrát. Přirozený substrát ACh je enzymaticky hydrolyzován, rozkladem vzniká cholin a kyselina octová, čímž dochází k okyselení, a tedy změně pH. Tohoto principu pro stanovení aktivity enzymu využívají potenciometrické metody, při kterých je měřena změna hodnoty pH respektive potenciálu enzymatické hydrolýzy přirozeného substrátu (ACh) (Holas et al., 2012). ACh má oproti nepřirozeným substrátům pro stanovení aktivity cholinesteras několik výhod, včetně vyšší citlivosti a biochemické relevance. Avšak jeho obtížná detekce představuje nevýhodu, jelikož ACh neabsorbuje v UV pásmu, nevykazuje fluorescenci, není redoxně elektroaktivní a je obtížné jej derivatizovat, což ztěžuje jeho monitorování v testech. V praxi se proto používá jak ACh, tak i nepřirozené substráty, a to v závislosti na konkrétních požadavcích testu (Cuartero et al., 2012).

Při použití syntetického substrátu místo přirozeného, se často využívají estery thiocholinu, např. acetylthiocholin (ATCh) nebo butyrylthiocholin (BuTCh). Syntetický substrát podléhá enzymatické hydrolýze a vzniklé množství produktu lze následně kvantifikovat (Holas et al., 2012). Mezi metody využívající syntetických substrátů ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras se řadí metody spektrofotometrické, které jsou jedny z nejméně používaných metod. Nejpoužívanější spektrofotometrická metoda je Ellmanova metoda (kapitola 3.3.3.1). Jedná se o test prováděný v UV-VIS oblasti, kde pomocí přístroje dochází k měření pohlceného záření vzorkem. Měřena je absorbance, vztah mezi absorbancí a koncentrací analytu vychází z Lambertova-Beerova zákona. Dalším typem spektrofotometrické metody, která využívá syntetické substráty, je metoda fluorimetrická, založená na měření fluorescenčního produktu. Metoda fluorimetrická má tu výhodu, že je ve většině případů mnohonásobně citlivější než odpovídající chromogenní metody. Tato metoda využívá často nefluorescenční substráty, jako je např. indoxylacetát, resorufinové estery nebo naftylestery. Tyto substráty podléhají enzymatické hydrolýze a poskytují vysoce fluorescenční produkty, které jsou kvantifikovány fluorimetricky při konkrétní excitační a emisní vlnové délce v závislosti na použitém substrátu. Mezi spektrofotometrické metody ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras se řadí také hmotnostní spektrometrické testy. Metody využívají kombinaci vysokoúčinné kapalinové

chromatografie s hmotnostní spektrometrií, což se uplatňuje např. při screeningu inhibitorů AChE v přírodních extraktech (Miao et al., 2010).

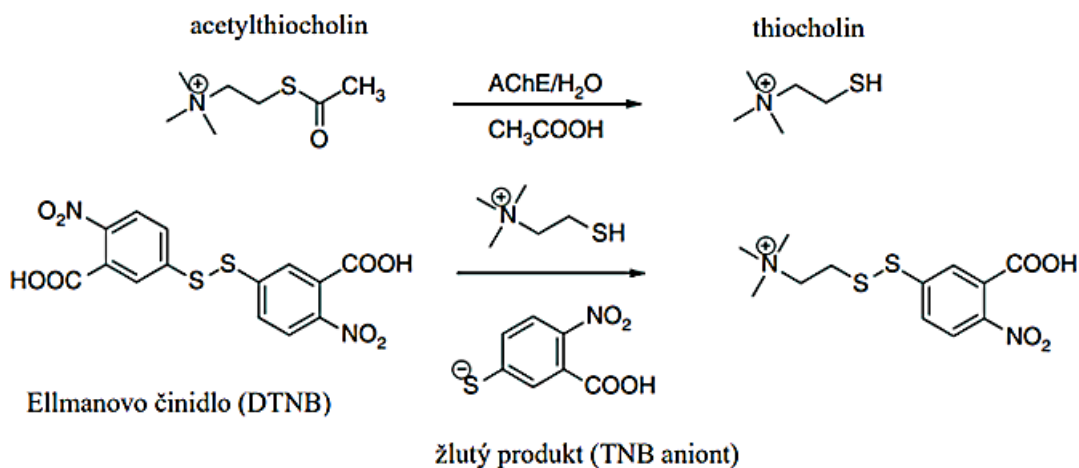
Mezi metody vhodné ke stanovení velmi nízké aktivity cholinesteras jsou řazeny radiometrické metody, jejichž předností je zejména vysoká citlivost. Je ale třeba vzít v úvahu i jisté nevýhody v podobě vysoké ceny, jelikož dochází k radioaktivnímu značení substrátu. Jednotlivé radiometrické metody se liší zejména ve způsobu, kterým dochází k oddělení radioaktivně značeného produktu (acetátu) od nehydrolyzovaného radioaktivně značeného substrátu (ACh). Jeden ze způsobů provedení radiometrické metody popsali Johnson a Russell (1975). Jako substrát je v testu použit ACh, u kterého je acetyl radioaktivně značen radioisotopem ^3H . V průběhu testu dochází k enzymatické hydrolýze ACh a uvolnění radioaktivně značeného acetátu, který je následně extrahován (toluenem) a měřen scintilační technikou. Metoda umožňuje selektivně měřit enzymatický produkt (^3H značený acetát), zatímco nehydrolyzovaný ^3H značený ACh zůstane neextrahovaný v malém vodném reakčním objemu (Johnson & Russell, 1975).

Pro měření aktivity cholinesteras se mohou používat také testy založené na tenkovrstvé chromatografii (TLC, z angl. thin layer chromatography). Enzymová aktivita je zjištěna na základě produkce bílých skvrn na barevném pozadí TLC destičky. Tato metoda je vhodná k rychlému a jednoduchému stanovení inhibiční aktivity cholinesteras a to zejména při screeningu rostlinných extraktů. Výhodou metody je, že lze testovat více rostlinných extraktů najednou (Marston et al., 2002).

3.3.3.1 Ellmanova metoda

In vitro Ellmanova metoda je nejvíce využívaná metoda ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras. Tato metoda patří mezi spektrofotometrické metody, kde je v UV-VIS oblasti měřena změna absorbance. Původní Ellmanova metoda vychází z hydrolýzy substrátu acetylthiocholinu (ATCh) enzymem AChE nebo substrátu butyrylthiocholinu (BuTCh) enzymem BuChE za vzniku příslušné kyseliny a thiocholinu (Obrázek 2). Meziprodukt thiocholin dále reaguje s Ellmanovým činidlem (DTNB), neboli kyselinou 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou), za vzniku 5-merkpto-2-nitrobenzoátového aniontu (TNB). Absorbance žlutého produktu je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm, jelikož při této vlnové délce vykazuje produkt silnou absorpci. Intenzita barvy produktu je přímo úměrná enzymatické aktivitě. Tato

metoda umožňuje snadno a poměrně rychle stanovit střední inhibiční koncentraci enzymu IC_{50} , což je koncentrace inhibitoru, která snižuje aktivitu enzymu o 50 % (Ellman et al., 1961).



Obrázek 2 Reakční schéma Ellmanovy metody (modifikované podle: Dingová et al., 2014)

Původní Ellmanova metoda je jednoduchou, rychlou a finančně relativně nenákladnou metodou, má ale i své limity. Tyto limitující faktory mohou ovlivňovat spolehlivost standardního Ellmanova testu, a proto byly vyvinuty modifikace Ellmanovy metody. Nevýhody původní Ellmanovy metody zahrnují nízkou citlivost detekce pro nízké aktivity cholinesterasy, citlivost DTNB na světlo, která se rozkládá pod vlivem světla, čímž se snižuje koncentrace DTNB, a to následně může ovlivnit výsledky testu (Dingová et al., 2014). Dalším omezením je interakce volných SH skupin thiocholinu ve vzorku s DTNB nebo např. spontánní hydrolýza esterů thiocholinu, která je urychlena zvýšenou teplotou nebo pH s hodnotou nad 8 (Holas et al., 2012).

Již zmíněné úskalí standardní metody nastává při použití pro biologické vzorky. Ellmanovo činidlo je v tomto případě nestabilní, reaguje s volnými sulfhydrylovými skupinami ve vzorku a může ovlivnit aktivitu enzymu. Z tohoto důvodu se Dingová et al. (2014) zabývali modifikací standardní Ellmanovy metody. Modifikovaný test se zaměřuje na překonání limitů standardní metody v oblasti nízké aktivity cholinesteras a stanovení aktivity cholinesteras při použití biologických vzorků. První krok metody spočívá v hydrolýze substrátu (ATCh nebo BuTCh) příslušným enzymem (AChE nebo BuChE) na meziprodukt reakce thiocholin za nepřítomnosti DTNB ve směsi. V druhém kroku je přidávána DTNB v časových intervalech

a sleduje se časová závislost produkce thiocholinu na přidávání DTNB. Absorbance žlutého produktu je měřena okamžitě při vlnové délce 412 nm. Touto modifikací je eliminována nestabilita DTNB v čase a interference s aktivitou cholinesteras. Studie potvrzuje také nestabilitu DTNB ve fosfátovém pufru a snižující se stabilitu DTNB v závislosti na rostoucím pH. V závěru studie je doporučeno používat testovaný HEPES pufr. Pokud je použití fosfátového pufru nevyhnutelné, je důležité zvolit pH v rozmezí 7 až 7,5 ke zvýšení stability DTNB (Dingová et al., 2014).

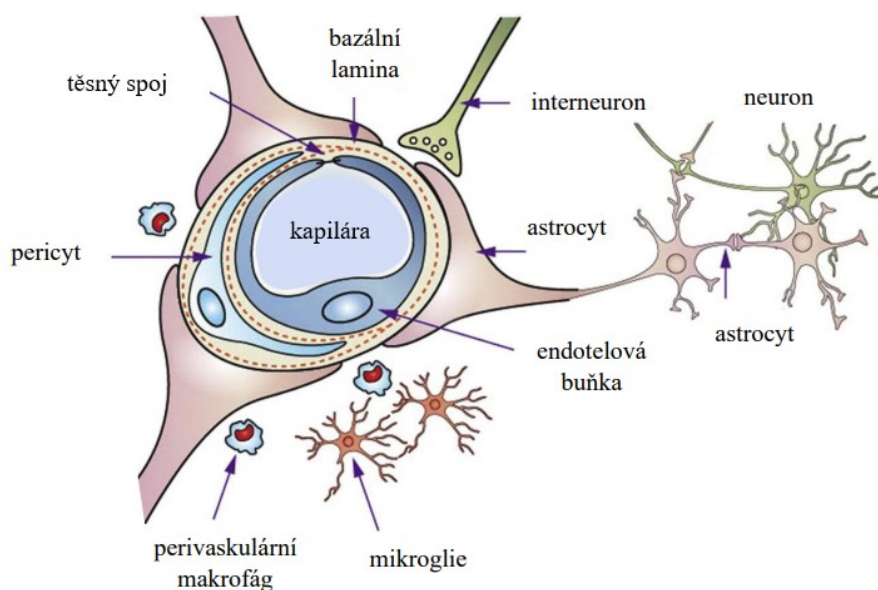
3.4 Stanovení průchodu látek do mozku

3.4.1 Hematoencefalická bariéra

Mozek je součástí CNS a je zásobovaný kyslíkem a dalšími potřebnými živinami díky mozkovým krevním cévám. Regulace pohybu iontů, molekul a buněk je zprostředkována HEB, která tvoří bariéru mezi mozkovou tkání a krevním oběhem. Úkolem bariéry je udržení homeostázy CNS, komunikace s periferií a ochrana nervové tkáně před patogeny a toxiny z krve procházející do mozku. Bariéra je také nezbytná při regulaci transportu látek do mozku, na kterém se podílejí transportní mechanismy (kapitola 3.4.2). HEB je fyziologická, semipermeabilní, specializovaná bariéra tvořená nefenestrovanými endotelovými buňkami, které představují základní stavební jednotku mozkové kapilární stěny. Sousední endotelové buňky kapilární stěny jsou spojeny těsnými spoji (Obrázek 3), které vytváří nepropustné spoje a regulují tak pohyb molekul, iontů a buněk z krve do mozku (Daneman & Prat, 2015).

Endotelové buňky společně s bazální membránou, pericyty, mikroglie, astrocyty a neurony tvoří neurovaskulární jednotku (NVU) (Obrázek 3). Bazální membrána je významnou součástí HEB, jelikož zpevňuje povrch endotelu, obklopuje pericyty a formuje spojení s okolními buňkami mozku. Astrocyty jsou gliové buňky, které mají podpůrnou funkci a tvoří spojení mezi stěnou endotelu a neuronem. Dodávají růstové faktory a živiny, čímž zprostředkovávají výživu neuronů a jejich správnou funkci (Cardoso et al., 2010). Mikroglie se vyskytují ve dvou formách, a tedy v aktivované a klidové formě. Jejich funkce se uplatňuje při imunitních odpovědích CNS, kdy v reakci na poruchu homeostázy CNS např. vlivem infekce dochází k jejich aktivaci (Sloan et al., 2012).

V rámci CNS existují také oblasti, které neobsahují HEB a jsou charakterizovány fenestrovaným endotelem. Jedná se o specializované nepárové struktury označované jako cirkumventrikulární orgány (CVOs), které se dělí dle funkce na sensorické a sekreční. Funkci sensorických CVOs zastává *area postrema*, subfornikální orgán a *organum vasculosum laminae terminalis*. Mezi CVOs sekreční se řadí *eminetia mediana*, neurohypofýza, epifýza a subkomisurální orgán. Kvůli přítomnosti fenestrovaných kapilár u CVOs je umožněna oboustranná komunikace mezi mozkem a krví, což je důležité pro neuroendokrinní interakce. CVOs představují oblasti, které umožňují také přestup látek (endogenních i exogenních) z krve do intersticiální tekutiny mozku a do mozkomíšního moku (Kaur & Ling, 2017).



Obrázek 3 Schematické znázornění složek tvořících NVU (HEB) (modifikované podle: Chen & Liu, 2012)

3.4.2 Mechanismy transportu látek přes hematoencefalickou bariéru

Na transportu látek do mozku se podílejí různé mechanismy a jejich průnik je regulován HEB, která představuje kritické rozhraní pro výměnu látek mezi mozkiem a krví. Jedním z možných mechanismů transportu je difuze. Přenos zprostředkovaný difuzí může probíhat paracelulárně nebo transcelulárně. Paracelulární přenos difuzí probíhá výhradně pasivně (bez využití energie) u malých hydrofilních molekul. Tyto molekuly difundují v omezené míře přes těsná spojení mezi endotelovými buňkami mozkových kapilár (Chen & Liu, 2012). Volná paracelulární difuze hydrofilních látek přes HEB je ve zdravém mozku inhibována pomocí těsných spojení. K porušení bariérové funkce ale dochází v případě patologických změn v rámci mozku, kde příkladem je autoimunitní neurozáněť CNS. V takovém případě dochází k snížení integrity těsných spojení a následkem je zvýšená paracelulární permeabilita (Engelhardt & Sorokin, 2009). Látky mohou přes HEB přecházet difuzí také transcelulárně, a to pasivně (Chen & Liu, 2012). To se týká malých neionizovaných molekul rozpustných v tucích, o nízké molekulové hmotnosti <400–500 Daltonů. Bohužel pouze malé procento léků vyhovuje těmto kritériím (Pardridge, 2003).

Dalším typem mechanismu pro transport látek přes HEB je transcelulární transport zprostředkovaný transportními proteiny (transport zprostředkovaný nosičem rozpuštěných

látek), který přenáší látky jako aminokyseliny, glukózu, hormony, mastné kyseliny a další. Příkladem je influxní transportér pro přenos glukózy GLUT1, který zásobuje mozek energií a probíhá ve směru koncentračního gradientu. V tomto případě probíhá přenos z jedné strany membrány na druhou stranu po navázání solutu na proteinový transportér (Sweeney et al., 2019).

Dalším mechanismem pro přenos látek do mozku je receptorem zprostředkovaná transcytóza, typická pro přenos růstových faktorů, enzymů a plazmatických proteinů. Transport probíhá interakcí makromolekul (např. inzulínu) s receptory, které se nachází ve specializovaných úsecích plazmatické membrány (tzv. povlečené jamky z angl. překladu *coated pits*). Po vazbě makromolekuly na receptor dochází k invaginaci povlečené jamky s receptory a navázaným ligandem do cytoplazmy, kde se následně uvolní z plazmatické membrány za vzniku vezikul. Poté, co endozom (vnitřní membránový váček vytvořený endocytózou) podstoupí okyselení, dojde k oddělení ligandu od receptoru, a ligand překročí druhou stranu membrány. Dalším typem transportu je adsorpčně zprostředkovaná transcytóza (AMT, z angl. *adsorptive-mediated transcytosis*), též nazývaná pinocytóza, která se odehrává díky elektrostatické interakci mezi kladně nabitou látkou a záporně nabitým povrchem plazmatické membrány. Při použití AMT se typicky využívají kationtové proteiny jako součást procesu doručování léčiv (Chen & Liu, 2012).

Významný pro udržení správné koncentrace iontů a funkce CNS je endoteliální transport iontů přes HEB, který reguluje pohyb např. sodných, draselných, chloridových a vápenatých iontů. Regulaci koncentrace iontů zprostředkovává např. abluminální sodíková pumpa (Na^+/K^+ -ATPasa, typ aktivního přenašeče). Tato pumpa reguluje přítok sodných iontů a odtok draselných iontů, což je důležité pro udržení elektrofyziologické rovnováhy (Sweeney et al., 2019).

Typem transportu využívající adenosintrifosfát (ATP, z angl. *adenosine triphosphate*) jako zdroj energie je endoteliální aktivní eflux, který využívá receptory nacházející se primárně na luminální straně endotelu HEB. Příkladem je efluxní transportér P-glykoprotein, který patří mezi klíčové, neboť sehrává důležitou úlohu při zabránění průchodu léčiv a toxinů přes HEB a zároveň usnadňuje jejich přepravu z mozku do krve (Chen & Liu, 2012).

3.4.3 Stanovení přechodu látek přes hematoencefalickou bariéru

HEB představuje velmi důležité rozhraní pro přechod látek do mozku. Reguluje tak mimo jiné i transport léčiv do mozku, což může být překážkou pro léčbu různých onemocnění. Ke zkoumání transportu látek přes biologické bariéry byly vyvinuty *in vivo*, *in vitro* a *in silico* metody, které s využitím umělých membrán, buněčných kultur i živých zvířat umožňují lepší porozumění přechodu látek přes HEB (Mühlbacher et al., 2011). Pro správnou predikci permeability HEB by neměly být vykonány pouze metody měření *in vitro*, a tedy je důležitá korelace měření provedená metodou *in vitro* se studii *in vivo* (Pardridge, 1999).

3.4.3.1 *In vivo* metody stanovení přechodu látek přes hematoencefalickou bariéru

Existují různé *in vivo* metody pro stanovení přechodu látky přes HEB, mezi které patří jednak invazivní metody jako technika *in situ* perfúze mozku, kvantitativní autoradiografie či intracerebrální mikrodialýza. Neinvazivní *in vivo* metody zahrnují pozitronovou emisní tomografii nebo zobrazování magnetickou rezonancí (Mensch et al., 2009).

Mezi využívané parametry měřené ke stanovení permeability HEB je řazen poměr koncentrace látky naměřené v mozku ku koncentraci látky měřené v krvi v ustáleném stavu. Poměr koncentrace léčiva v mozku ku koncentraci léčiva v krvi je vyjádřen jako \log_{BB} a udává distribuci měřené látky mezi mozkiem a krví (Carpenter et al., 2014).

$$\text{Log}_{BB} = \log \left(\frac{[c] \text{ brain}}{[c] \text{ blood}} \right)$$

Kde ($c \text{ brain}$) vyjadřuje koncentraci látky v mozku a ($c \text{ blood}$) koncentraci látky v krvi (Mühlbacher et al., 2011). Určení \log_{BB} pouze v jednom časovém bodě má nízkou vypovídající hodnotu, jelikož je závislé na zvoleném čase a vztahu mezi koncentracemi v plazmě a mozku v daném momentě. Vhodnějším ukazatelem je poměr ploch pod křivkou (AUC, z angl. area under curve) pro koncentrace v mozku a v plazmě (Abbott, 2004). Látky, u kterých je zjištěn poměr (mozek/plazma) >1 pronikají přes HEB snadno, látky s poměrem (mozek/plazma) $>0,3-0,5$ pronikají omezeně do mozku a látky s poměrem (mozek/plazma) $<0,1$ nemusí být schopny proniknout přes HEB (Mensch et al., 2009). Měření \log_{BB} je časově náročné a zároveň nákladné zejména z hlediska většího množství testovaných zvířat. \log_{BB} není dokonalým měřítkem propustnosti HEB, jelikož nebere v úvahu všechny faktory, které ovlivňují distribuci látek v mozku (Abbott, 2004).

Další metodou, která se používá pro stanovení přechodu látky přes HEB je metoda injekční aplikace jednorázové dávky do karotické tepny. Do krční tepny zvířete v anestezii (nejčastěji potkana) je vstříknuta jednorázová injekce obsahující radioaktivně značenou testovanou látku (značená ^3H) a referenční standard (značený ^{14}C), nebo naopak. Následně je zvíře dekapitováno 5–15 sekund po aplikaci injekce, z mozkové tkáně je zjištěna koncentrace testované a referenční sloučeniny, které se porovnají s plazmatickými koncentracemi. Zjištěné hodnoty jsou základem pro výpočet BUI (z angl. brain uptake index), tedy indexu vychytávání mozku. Referenční sloučenina umožňuje kvantifikovat množství vstříknutého materiálu, které proniklo do mozku, a slouží tak jako vnitřní standard. Pouze zhruba 20 % vstříknutého objemu se dostane do vnitřní krční tepny a zbylých 80 % dosáhne vnější krční tepny (Mensch et al., 2009). Předpokladem pro výpočet BUI je, že vnitřní standard volně prochází skrz HEB, testovaná látka neprochází zpět skrz HEB do krve a nedochází k metabolismu testované látky před provedením dekapitace (Nicolazzo et al., 2006).

Index vychytávání mozku je vyjádřený následující rovnicí:

$$\text{BUI} = 100 \times \left(\frac{[^3\text{H}] \text{ dpm} / [^{14}\text{C}] \text{ dpm (mozek)}}{[^3\text{H}] \text{ dpm} / [^{14}\text{C}] \text{ dpm (injekční roztok)}} \right)$$

kde dpm je dezintegrace za minutu. Nevýhodou metody je krátká expozice testované látky mozku, proto testované látky musí se střední až vysokou propustností procházet přes HEB (Mensch et al., 2009).

Dalším *in vivo* měřeným parametrem pro kvantifikaci průchodu látky přes HEB je permeabilita povrchem plochy (permeability surface, PS) vyjádřená jako logPS. Měření logPS probíhá s využitím perfúzní metody (viz níže), která je sice technicky náročná, ale nabízí přímé měření pravděpodobné permeability HEB díky eliminaci sérové vazby měřené sloučeniny. Tudiž je tento deskriptor více informativní v porovnání s parametrem logBB. Měření logPS nemusí probíhat v ustáleném stavu (Carpenter et al., 2014). Technika *in situ* perfúze mozku vychází z perfúze mozku krční tepnou, do které je umístěn perfúzní katetr, metoda je prováděna u zvířete v anestezii. Krční tepnou proniká do mozku perfuzát (testovaná látka rozpuštěná v umělé krvi či fyziologickém roztoku), regulovaný pomocí perfúzní pumpy. Čas ukončení perfúze zkoumané látky do mozku je předem dán a poté je zvíře dekapitováno a stanoveno množství látky, která pronikla do mozku. Do měření by měla být také zahrnuta radioaktivně značená referenční sloučenina (např. radioaktivně značená sacharóza) sloužící

pro určení objemu mozkové plazmy (Nicolazzo et al., 2006). Parametrem měřeným pro kvantifikaci přechodu látky přes HEB je zde permeabilita povrchem plochy (PS), která je vyjádřena následující rovnicí:

$$PS = \left(\frac{Vd - Vo}{t} \right)$$

kde t je doba trvání perfúze, Vd je distribuční objem testované sloučeniny a Vo je objem distribuce pro sloučeniny v plazmatickém objemu (sacharóza). Perfúze mozku *in situ* má tu výhodu, že testovaná sloučenina se nedostane do celého organismu, a proto se nemetabolizuje v jiných orgánech. Metabolismu v mozkové mikrocirkulaci se však vyhnout nelze. Další významnou předností metody je, že umožňuje dokonalou kontrolu nad koncentrací rozpuštěných látek v perfuzátu. Díky tomu je možné snadno ovlivnit i další složky perfuzní tekutiny. V porovnání s metodou injekční aplikace jednorázové dávky je metoda *in situ* perfúze mozku citlivější, protože dochází k prodloužení expozice látky na dobu delší než 15 sekund (Mensch et al., 2009). Nevýhodou metody je velký počet zvířat nutný pro získání relevantních údajů a nespecifická adsorpce testované látky do mozkové tkáně (Sloan et al., 2012).

In vivo metody k měření parametrů pro predikci přechodu látek do mozku jsou finančně i časově náročné a pracné. Proto se často při primárním screeningu testovaných látek využívají nejprve *in vitro* a *in silico* metody, které se uplatňují zejména v raných fázích výzkumu (Carpenter et al., 2014).

3.4.3.2 *In vitro* metody stanovení přechodu látek přes hematoencefalickou bariéru

Permeabilita léčiva je důležitým parametrem pro dosažení terapeutického účinku a k jejímu odhadu bylo vyvinuto mnoho *in vitro* metod, které využívají jak buněčné testy, tak i umělé membrány. Mezi nebuněčné testy využívající umělou membránu ke stanovení předpokladu průchodu testované látky skrz biologické bariéry je řazena metoda PAMPA (z angl. parallel artificial permeability assay) nebo také chromatografie s imobilizovanou umělou membránou. Metoda PAMPA má značné výhody v podobě komerční dostupnosti, vysoké výkonosti a malé spotřebě vzorku testovaných látek. Oproti tomu metody využívající buněčné kultury jako je např. buněčný Caco-2 model nebo modely využívající monovrstvy PBCEC (primární buňky endotelu krevních mozkových kapilár), jsou finančně nákladnější metody, které jsou zároveň i časově náročnější. V praxi jsou často buněčné a nebuněčné metody kombinovány k zajištění účinnosti a reprodukovatelnosti výsledků (Mensch et al., 2009).

Pro predikci průchodu látek přes HEB se používá metoda PAMPA, která se provádí v 96-ti jamkové aparatuře skládající se z donorové a akceptorové části. Tato metoda byla poprvé představena Kansy et al. v roce 1998. V průběhu testu přechází testovaná látka z donorové do akceptorové části přes umělou lipidovou membránu pasivní difuzí. Průběh testu spočívá v rozpuštění testované látky v DMSO (dimethylsulfoxid) za vzniku zásobního roztoku. Určité množství tohoto zásobního roztoku je odebráno a zředěno fosfátovým pufrům PBS (z angl. phosphate buffer saline) k vytvoření sekundárního zásobního roztoku (měřený roztok) o konkrétní koncentraci. Na dně donorové destičky se nachází filtrační membrána, na kterou je nanesen polární mozkový lipid (PBL, z angl. polar brain lipid) rozpuštěný v dodekanu. Do 96-ti jamkové donorové části je pipetováno určité množství měřeného roztoku. Do 96-ti jamkové akceptorové části je pipetován pufr PBS o pH 7,4, tyto dvě části jsou spojeny do tzv. „sendvičového“ uspořádání. Při inkubaci za pokojové teploty testovaná látka difunduje z donorové do akceptorové části přes uměle vytvořenou lipidovou membránu, která simuluje „HEB“ (Kansy et al., 1998). V průběhu testu se v definovaných časových intervalech odebírají vzorky z obou kompartmentů ke stanovení permeability (permeačního koeficientu, P_e). Koncentrace sloučeniny se kvantifikuje pomocí LC-MS systému nebo měřením absorbance s využitím spektrofotometru. Zjištěné koncentrace testovaných látek slouží k výpočtu permeačního koeficientu P_e . Metoda PAMPA se nejprve používala pro predikci perorální absorpce testovaných látek z gastrointestinálního traktu. Di et al. (2003) modifikovali a validovali tuto metodu a rozšířili její použití i na hodnocení průchodu látek přes HEB (Di et al., 2003).

Fosfolipidy používané pro tvorbu umělé lipidové membrány jsou pevné látky, které se rozpouští v nepolárních rozpouštědlech, jako je např. *n*-dodekan. Di et al. (2003) využili extrakt z prasečí mozkové tkáně rozpuštěný v dodekanu jako modelový lipid. Pomocí této metody se jim podařilo úspěšně rozlišit sloučeniny, které dokáží procházet lipidovou membránou centrálního nervového systému (CNS+), a těmi, které tuto bariéru překonat nemohou (CNS-) (Kansy et al., 2004). Di et al. (2003) tedy vyvinuli a validovali modifikaci PAMPA testu s použitím lipidů z prasečího mozku, což mělo za cíl zlepšení předpovědi penetrace HEB. Experiment porovnává PML (fosfatidylcholin rozpuštěný v dodekanu), který se využívá pro predikci gastrointestinální permeace, s PBL. Výsledky experimentu ukazují, že použitý PBL poskytl méně falešně negativních dat než PML, a tedy test PAMPA s použitím PBL je pro svoji vysokou úspěšnost vhodný pro predikci permeability HEB. Aby se v testu PAMPA

dosáhlo přesné predikce perorální absorpce, měří se permeabilita při různých hodnotách pH. Tímto způsobem se simuluje proměnlivé pH gastrointestinálního traktu. Naproti tomu v testu PAMPA pro predikci permeace přes HEB je kvůli konstantnímu pH v krevním kompartmentu nutné pouze pH 7,4 (Di et al., 2003).

Metoda PAMPA se běžně používá v rané fázi výzkumu léčiv jako primární screeningový nástroj, který poskytuje informace o pasivní transcelulární difuzi testovaných sloučenin, ale nezahrnuje již facilitované, paracelulární a efluxní transportní mechanismy. Proto je vhodné kombinovat metodu PAMPA s dalšími testy biologického transportu pro rozlišení již zmíněných mechanismů transportu (Kansy et al., 2004).

Mezi buněčné *in vitro* metody patří technika využívající Caco-2 buněčnou linii, která umožňuje stanovit permeabilitu biologických membrán. Tato metoda se používá zejména pro *in vitro* predikci střevní absorpce po perorálním podání, ale byla testována také jako metoda pro stanovení pravděpodobnosti průchodu látek přes HEB (Mensch et al., 2009). Rubas et al. (1996) se zabývali chybějícími daty v literatuře, které by přímo srovnávaly, jak se různé látky vstřebávají v monovrstvách Caco-2 a v lidském tlustém střevě a konečniku. Charakteristiky vychytávání v lidském tlustém střevě a konečniku se zdají být podobné jako u monovrstev buněk Caco-2, a tedy Caco-2 model by mohl sloužit jako predikce pro propustnost lidského tlustého střeva a konečniku pro různé typy léčiv (Rubas et al., 1996). Výhoda metody s použitím monovrstvy buněk Caco-2 spočívá v tom, že zahrnuje také aktivní transport testovaných látek. Lohmann et al. (2002) se ve své studii zabývali různými *in vitro* testy pro predikci permeability HEB. Pro simulaci HEB využili také již zmíněnou monovrstvu z buněčné linie Caco-2, která je odvozená z diferencovaných buněk lidského karcinomu tlustého střeva. Z výsledků studie vyplývá, že Caco-2 buněčný model poskytl nejlepší korelaci s výsledky z modelu HEB *in vitro*, ale stále existují značné rozdíly mezi buňkami střevního a mozkového původu. Z toho vyplývá, že monovrstvy Caco-2 nemusí vždy přesně předpovídat propustnost HEB. Pro přesnější *in vitro* predikci permeability HEB je lepší využít monovrstvy PBCEC (primární buňky endotelu krevních mozkových kapilár), které lépe odrážejí vlastnosti HEB, a poskytují tak spolehlivější výsledky (Lohmann et al., 2002). Značnou nevýhodou buněčných metod je ovšem jejich mnohonásobně vyšší cena a časová náročnost v porovnání s metodou PAMPA (Mensch et al., 2009).

Jako model HEB se využívá také lidská cerebrální endoteliální buněčná linie hCMEC/D3, která představuje model lidské HEB pro studium transportních mechanismů v rámci CNS. Tato buněčná linie je odvozená z tkáně, konkrétně z mikrocév lidského temporálního laloku.

Buněčná linie hCMEC/D3 má schopnost vytvářet kontaktem inhibovanou monovrstvu prodloužených buněk kolagenového typu I nebo IV. Buňky hCMEC/D3 exprimují funkční efluxní transportéry, z nichž nejvýznamnější je P-glykoprotein, dále protein rezistence k rakovině prsu a proteiny asociované s multirezistencí. U buněk hCMEC/D3 bylo taktéž prokázáno, že exprimují ve vysoké míře zejména glukózový transportér GLUT1, dále také transferinový receptor, neutrální a kationtový přenašeč AMK nebo také kationtový transportér OCT-1 a v menší míře OCT-2 a OCT-3 a další. Buněčná linie hCMEC/D3 byla zkoumána také z hlediska interakce mezi lidským mozkovým endotelem a imunitními buňkami (lymfocyty, monocyty), které jsou aktivovány na základě probíhajícího zánětu CNS. V takovém případě dochází k zvýšené paracelulární permeabilitě v rámci HEB. Buněčná linie hCMEC/D3 slouží jako užitečný model pro testování odezvy na tyto zánětlivé podněty. Buněčná linie hCMEC/D3 také slouží jako vhodný model pro zkoumání toxických účinků testovaných látek na mozkovou mikrocirkulaci v rámci neurodegenerativních onemocnění jako je např. Alzheimerova choroba. Studie efluxních a transcelulárních transportních systémů vyjádřených mozkovými endoteliálními buňkami jsou nezbytné pro pochopení mechanismů, kterými léky pronikají do mozku, a pro predikci jejich účinnosti a toxicity. Buněčná linie hCMEC/D3 představuje významný model lidské HEB, který je stabilní a lze snadno pěstovat. Mimo jiné u této buněčné linie bylo také prokázáno, že si zachovává expresi většiny transportérů a receptorů exprimovaných *in vivo* v lidské HEB (Weksler et al., 2013).

Další buněčnou linií, která je vhodná jako model lidské HEB, je buněčná linie hBMEC. Jedná se o lidské mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky, které jsou odvozené z lidských pluripotentních kmenových buněk (hPSC). Bylo prokázáno, že tato buněčná linie opět poskytuje strukturální a funkční charakteristiky, které připomínají *in vivo* HEB. Nicméně u této buněčné linie je obtížná izolace z mozkové tkáně a vyšší finanční náročnost, z toho důvodu je lepší možností využít buněčnou linii hCMEC/D3 (Stebbins et al., 2016).

3.5 Metody ke stanovení buněčné viability

Životaschopnost (viabilita) buněk, tedy počet zdravých buněk v daném vzorku, a proliferace buněk, představují klíčové parametry při screeningu léčiv. Buněčné kultury slouží jako důležitý nástroj pro *in vitro* hodnocení těchto zkoušených látek. Testování na buněčných kulturách umožňuje sledovat vliv zkoumané látky na růst, toxicitu a další aspekty fungování buněk. Na základě typu buněčné reakce, cytostatického (zastavení růstu) nebo cytotoxického (poškození a smrt), lze vyhodnotit potenciální terapeutický efekt zkoušené látky. Existuje celá řada metod, které se používají ke stanovení buněčné viability a cytotoxicity. Tyto metody lze klasifikovat např. dle cílení na buněčné funkce, podle toho, zda cílí na enzymovou aktivitu, permeabilitu buněčné membrány, buněčnou adhezenci, produkci ATP, produkci koenzymů či aktivitu příjmu nukleotidů (Adan et al., 2016). Kromě výše uvedeného dělení můžeme metody ke stanovení buněčné viability a cytotoxicity také rozdělit dle použitého typu měření na metody kolorimetrické, fluorimetrické, luminometrické a dye exclusion metody (Aslantürk, 2018).

3.5.1 Dye exclusion metody

Příkladem dye exclusion metody je metoda využívající trypanovou modř. Princip metody spočívá v propustnosti barviva, kdy živé buňky mají neporušenou membránu a dokáží barvivo vyloučit, zatímco mrtvé buňky mají propustnou membránu a barvivo propustí dovnitř. Trypanová modř je diazobarvivo, které živé buňky díky vysoké selektivitě neporušené membrány nepropouštějí dovnitř buňky (zůstanou bezbarvé). Naproti tomu mrtvé buňky absorbují toto barvivo, jelikož selektivita buněčné membrány je porušena (zmodrají). Tato metoda je běžnou laboratorní metodou, u které je počet živých/mrtvých buněk vztažen na jednotku objemu. Kvantifikace buněčné populace se provádí mikroskopicky (Strober, 1997). Značnou výhodou metody je její finanční nenáročnost a snadná proveditelnost, ovšem při velkém počtu vzorků se stává časově náročnou metodou. Nelze opomenout ani to, že tato metoda nedokáže rozlišit apoptózu od nekrózy buňky a má mnohem nižší citlivost než jiné testy ke stanovení buněčné viability a cytotoxicity. Trypanová modř je nejčastěji používaným barvivem pro tuto metodu, i když se v praxi používají i další, jako je eosin, Congo červeně a erythrosin B. Metody založené na vylučování barviv se běžně používají pro buňky rostoucí v suspenzi, ale pro nízké počty buněk není tato metoda vhodná (Aslantürk, 2018).

3.5.2 Kolorimetrické metody

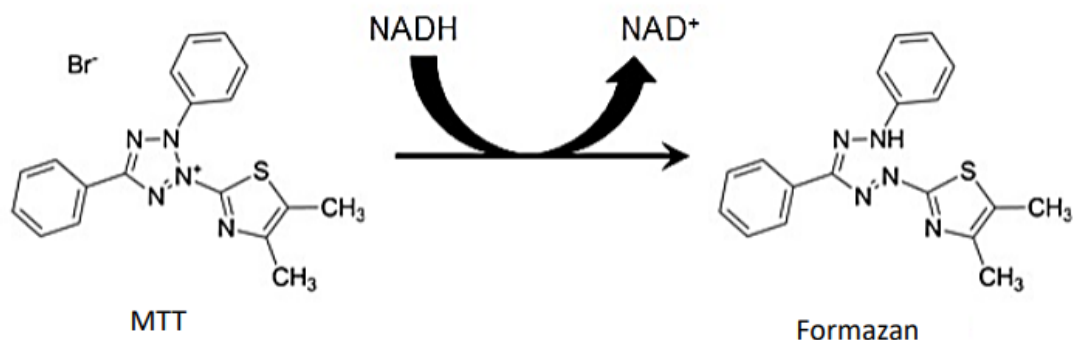
Kolorimetrické testy fungují obecně na principu hodnocení metabolické aktivity buněk. Použitá buněčná linie interaguje s chemickými činidly za vzniku barevného produktu v závislosti na životaschopnosti těchto buněk. Barevný produkt je měřen spektrofotometricky při dané vlnové délce. Výsledkem je hodnota absorbance, ze které se dále vypočítá procentuální viabilita nebo cytotoxicita. Kolorimetrické metody zahrnují širokou škálu testů, z nichž nejrozšířenější jsou ty, které používají jako činidla různé typy tetrazoliových solí (kapitola 3.5.2.1). I když testy s tetrazoliovými solemi představují nejrozšířenější skupinu kolorimetrických testů, existují i další typy testů, které do této kategorie spadají. Mezi ostatní testy se řadí např. laktátdehydrogenázový test (LDH test), Sulforhodamin B test, test s krystalovou violetí (CVS test) či test s neutrální červení (Aslantürk, 2018).

3.5.2.1 Metody využívající tetrazoliové soli

Kolorimetrické metody s využitím tetrazoliových solí, mezi které patří např. MTT test, MTS test a XTT test, představují široce používanou skupinu analytických technik pro kvantifikaci buněčné viability, proliferace a cytotoxicity. Tyto testy se opírají o princip redukce tetrazoliových solí metabolicky aktivními buňkami na barevné produkty (formazany), které lze následně spektrofotometricky měřit (Stockert et al., 2018).

Jedním z hojně využívaných testů je MTT test, který byl poprvé popsán Timem Mosmannem již v roce 1983. Mosmann (1983) se zaměřil na použití substrátu, který je živými buňkami metabolizován na barevný produkt, mrtvými buňkami však nikoli. K tomu využil tetrazoliovou sůl MTT neboli (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), u které je tetrazoliový kruh štěpen mitochondriemi živých buněk. Princip metody vychází z enzymatické metabolizace žluté tetrazoliové soli MTT, která je ve vodě rozpustná, na fialový formazan, ve vodě nerozpustný (Obrázek 4) (Mosmann, 1983). Redukce soli MTT na formazan probíhá na základě působení mitochondriálních enzymů (zpravidla dehydrogenas a oxidoreduktas). Vzniklý formazan se vyznačuje lipofilitou, která mu umožňuje pronikat buněčnými membránami, avšak ve fyziologickém prostředí buněk je špatně rozpustný. Ke změření absorbance se musí krystaly formazanu nejprve rozpustit v organických rozpouštědlech. Mosmann (1983) použil k extrakci formazanu kyselý isopropylalkohol, který měl jisté limity v podobě nízkých hodnot optické absorpce. Z toho důvodu navrhli Carmichael et al. (1987) použití organického rozpouštědla DMSO, které se používá i v dnešní době

(Stockert et al., 2018). Vzniklý fialový roztok formazanu se měří spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm a referenční vlnové délce 630 nm. Intenzita fialového zbarvení roztoku formazanu odpovídá počtu metabolicky životaschopných buněk, tedy čím více fialový roztok, tím více buněk je životaschopných při dané koncentraci (Mosmann, 1983).



Obrázek 4 Redukce MTT na formazan (modifikované podle: Kamiloglu et al., 2020)

Použití MTT testu pro hodnocení buněčné viability, proliferace a cytotoxicity má mnoho výhod. Mezi významné výhody testu patří zejména rychlost a jednoduchost provedení. Metoda umožňuje odečítání výsledků testu bez nutnosti odstraňování či vymývání vzorků. Test může být hodnocen chvíli po přidání organického rozpouštědla a barva vzniklého roztoku zůstává stabilní i několik hodin po rozpuštění. Navíc můžeme intenzitu zbarvení roztoku hodnotit i vizuálně (Mosmann, 1983). K minimalizaci falešně pozitivních a falešně negativních výsledků způsobených interferencí pozadí z částic je nutné provést další kontrolní experimenty, aby nedošlo k nadhodnocení životaschopnosti buněk. Pro zamezení zkreslení výsledků vlivem pozadí je nezbytné zahrnout do experimentu negativní kontrolu. Tato kontrola by měla obsahovat pouze médium bez buněk a/nebo testované barvivo (Aslantürk, 2018).

Nevýhodou MTT testu je tvorba nerozpustných formazanových krystalů, která ztěžuje a prodlužuje tento test. To vedlo k vývoji rozpustných sulfonovaných tetrazoliových solí, jako je např. XTT, MTS, WST-1 a WST-8, což představuje významný pokrok v oblasti testování životaschopnosti buněk. Formazany těchto tetrazoliových solí se rozpouštějí přímo v kultivačním médiu buněk, čímž se práce s metodou stává jednodušší a časově méně náročnou (Stockert et al., 2018). XTT test s využitím tetrazoliové soli XTT neboli 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid, byl poprvé představen Scudiero et al. (1988). Princip XTT testu využívá schopnost metabolicky aktivních buněk redukovat

tetrazoliovou sůl XTT na ve vodě rozpustný oranžový formazanový produkt. Intenzitu barevného produktu lze měřit spektrofotometrem při vlnové délce absorpčního maxima, a to při 475 nm. Čím více životaschopných buněk je v testovaném vzorku, tím intenzivnější je oranžové zbarvení a tím vyšší je hodnota absorbance naměřená spektrofotometrem. Výhodou XTT testu je eliminace solubilizace vzniklého formazanu, což zkracuje a zjednodušuje proces testu. Většina lidských nádorových buněčných linií metabolizuje XTT méně účinně než MTT. To znamená, že produkují méně formazanu, a proto je absorbance nižší. Přidání fenazin methosulfátu výrazně zvyšuje buněčnou redukci XTT. To vede k silnějšímu zbarvení formazanu a umožňuje snazší a přesnější měření absorbance (Scudiero et al., 1988).

3.5.2.2 Ostatní kolorimetrické metody

Kromě testů s tetrazoliovými solemi je důležité zmínit i další typy kolorimetrických testů, které se používají ke stanovení buněčné viability a cytotoxicity. Jedním z nich je laktátdehydrogenázový test (LDH test), který měří toxicitu látky na základě množství enzymu LDH, který se uvolňuje z poškozených buněk. Tento test využívá LDH jako indikátor poškození buněk, jelikož zdravé buňky LDH neuvolňují. Uvolněný enzym LDH je kvantifikován přidáním diaforasy, která katalyzuje přeměnu tetrazoliové soli na červený formazan. Barevný produkt je stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Tato metoda je rychlá a jednoduchá, nicméně je důležité zmínit to, že metoda může být omezena vlastní aktivitou LDH použitého séra či dalších sloučenin (Aslantürk, 2018).

Další kolorimetrickou metodou je např. CVS test. Základní princip metody spočívá v odstranění odumřelých buněk proplachováním kultivované vrstvy. U adherentních buněk totiž dochází k oddělení od destičky s buněčnou kulturou během buněčné smrti. Následně se živé buňky přilnuté k podkladu obarví krystalovou violetí. Toto barvivo se specificky váže na DNA a proteiny živých buněk, čímž je zbarví do fialova. Pro spektrofotometrické hodnocení je nutné do buněčné kultury přidat rozpouštědlo (např. methanol). V tomto případě opět platí, že čím více je fialové zbarvení intenzivní, tím více je životaschopných buněk (Feoktistova et al., 2016). Tato metoda je poměrně rychlá, ale nedokáže hodnotit změny v buněčné metabolické aktivitě. Mimo jiné je také důležité zmínit, že použitím CVS testu dochází k usmrcení buněk a jedná se tedy o end-point esej (Aslantürk, 2018).

3.5.3 Fluorimetrické metody

Zkoumání nových metod přispělo k objevu citlivější alternativy k běžným kolorimetrickým a dye exclusion metodám, a tedy ke vzniku fluorimetrických metod. Princip spočívá v enzymatickém štěpení nefluoreskující sloučeniny, čímž vzniká fluoreskující produkt. Ten je následně detekován a umožňuje kvantifikaci analytu. Fluorimetrické metody se těší rostoucí oblibě díky své citlivosti a jednoduchosti (Kamiloglu et al., 2020). Mezi nejznámější příklady fluorimetrických esejí k hodnocení viability buněk a cytotoxicity patří resazurinová (Alamar Blue) esej, Calcein-AM esej či test markerů životaschopnosti proteasy (Aslantürk, 2018).

3.5.3.1 Alamar Blue test

Alamar Blue test (také známý jako test redukce resazurinu) se stal populárním nástrojem pro zkoumání vlivu testovaných sloučenin na cytotoxicitu a životaschopnost buněk. Test využívá resazurin, fluorimetrický redoxní indikátor, který je zpočátku modrý a nefluorescenční. Po vstupu do buněk se v redukčním prostředí cytosolu resazurin redukuje na resorufin, růžově fluorescenční látku. Resorufin je dále redukován na bezbarvý hydroresorufin, který ztrácí schopnost fluorescence. K redukci dochází pouze u životaschopných buněk, které redukují resazurin na resorufin, čímž ovlivňují fluorescenci a barvu média, ve kterém jsou kultivovány. Ke kvantitativnímu vyhodnocení životaschopnosti buněk dochází nejčastěji měřením fluorescence s použitím fluorometru. Alamar Blue test je také možné vyhodnotit spektrofotometricky měřením absorbance, což se ale jeví jako méně citlivé oproti měření fluorescence. Jednou z hlavních předností tohoto testu je jeho netoxičita pro buňky. Díky tomu je možné buňky po testování znovu použít, čímž se šetří zejména finanční prostředky vynaložené na výzkum. Před provedením testu je vhodné zkontrolovat, zda resazurin neinteraguje s testovanou látkou, aby nedošlo ke vzniku falešně pozitivních či negativních výsledků. Je také důležité optimalizovat podmínky testování (koncentrace resazurinu a doba inkubace), aby nedocházelo k nadměrné redukci na nefluoreskující hydroresorufin (O'Brien et al., 2000).

3.5.3.2 Calcein-AM esej

Test s využitím calcein-AM (calcein acetomethoxyester) je citlivá a rychlá metoda vhodná k hodnocení buněčné viability. Metoda spočívá v metabolizaci calcein-AM (nefluoreskující derivát fluoresceinu) na zeleně fluorescenční calcein. Calcein-AM prochází

pasivně skrz buněčnou membránu životaschopných buněk. K metabolizaci dochází působením cytosolových esteraz za vzniku hydrofilního calceinu, který skrz membrány neprochází. Fluorescenční signál calceinu je měřen fluorometrem při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 530 nm. Pouze živé buňky s aktivním metabolismem fluoreskují, protože cytoplazmatické esterasy v poškozených nebo mrtvých buňkách nemohou být aktivní (Bratosin et al., 2005).

3.5.4 Luminometrické metody

Luminometrické metody, též bioluminiscenční, jsou velmi citlivé metody, které jsou založeny na detekci luminiscenčního signálu, který je úměrný počtu životaschopných buněk. Nevýhoda těchto metod spočívá zejména v tom, že jsou finančně nákladné z hlediska speciálního vybavení potřebného k měření. Mezi luminometrické metody se řadí např. ATP test nebo test životaschopnosti v reálném čase (Aslantürk, 2018).

3.5.4.1 ATP test

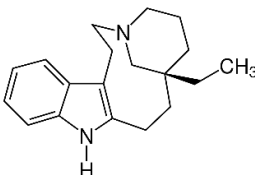
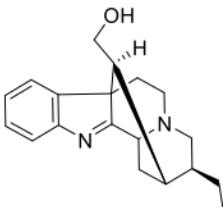
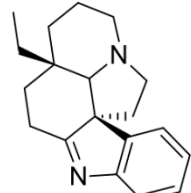
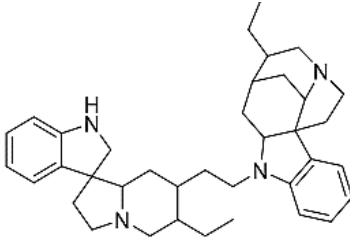
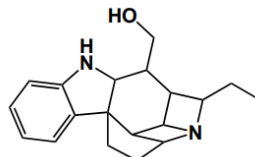
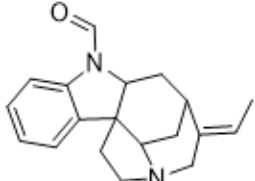
Crouch et al. (1993) se zabývali využitím bioluminiscence ATP ke stanovení buněčné proliferace a cytotoxicity. Nukleotid ATP je přítomen ve všech životaschopných buňkách a je nepostradatelný z hlediska energetické výměny v biologických procesech buněk. Všechny živé buňky potřebují k plnění specializovaných funkcí ATP, pokud je buňka poškozena či nemá dostatek kyslíku/substrátu, dochází ke snížení produkce ATP. V případě buněčné smrti dochází postupem času k vyčerpání hladin ATP vlivem probíhající hydrolyzy ATP. Ke stanovení buněčné viability prostřednictvím stanovení intracelulárního ATP je zapotřebí vhodného činidla. Činidlo způsobuje lýzu buněk, což vede k uvolnění ATP, který je stanoven reakcí s enzymem luciferin-luciferasou. Na základě této reakce vzniká oxyluciferin a dochází k emisi světla, která je měřena pomocí luminometru. Intenzita luminiscence se zvyšuje s narůstajícím obsahem ATP, jelikož koncentrace ATP přímo odpovídá počtu životaschopných buněk (Crouch et al., 1993). Test ATP je rychlá metoda, která je také v porovnání s ostatními metodami nejcitlivější. Výhodou je také to, že luminiscenční signál je ustálen zhruba do 10 minut po přidání činidla a poté zůstává stabilní až několik hodin (Aslantürk, 2018).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Testované alkaloidy

Přehled testovaných alkaloidů a molekulových hmotností je uveden v Tabulce 8.

Tabulka 8 Molekulová hmotnost a strukturní vzorce testovaných alkaloidů

Testované alkaloidy	Molekulová hmotnost	Strukturní vzorec
Quebrachamin	282,4	
Geissosreticulatin	296,2	
1,2-didehydroaspidospermidin	280,0	
Nová látka 1	590,4	
Diastereomer geissoschizolinu	298,2	
Nová látka 2	294,4	

4.2 Biologická aktivita testovaných alkaloidů

4.2.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči rekombinantní humánní acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase

Pro stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči rekombinantním humánním enzymům AChE a BuChE byla využita *in vitro* metoda, a to Ellmanova spektrofotometrická metoda. Princip metody a reakční schéma jsou uvedeny v kapitole 3.3.3.1.

4.2.1.1 Testované látky

Měření inhibiční aktivity vůči enzymům bylo provedeno s testovanými alkaloidy geissosreticulatinem, novou látkou 1, diastereomerem geissoschizolinu a novou látkou 2.

4.2.1.2 Použitý biologický materiál a chemikálie

- Acetylcholinesterasa, rekombinantní lidský enzym (Katedra chemie, PŘF UHK, ČR)
- Acetylthiocholin jodid, p. a. (Sigma Aldrich, ČR)
- Butyrylcholinesterasa, rekombinantní lidský enzym (Katedra chemie, PŘF UHK, ČR)
- Butyrylthiocholin jodid, p. a. (Sigma Aldrich, ČR)
- Dimethylsulfoxid, p. a. (Sigma Aldrich, Německo)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's phosphate buffer saline, pH = 7,4) (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová), ≥ 98% (Sigma Aldrich, ČR)

4.2.1.3 Použité přístroje

- Spektrofotometr Synergy HT (BioTek, USA)

4.2.1.4 Použité rekombinantní enzymy

Rekombinantní enzymy AChE a BuChE byly připraveny na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty na Univerzitě Hradec Králové. Médium s enzymy bylo v čas potřeby naředěno 100 mM fosfátovým pufrem o pH 7,4. Médium s enzymy bylo uchováno do doby použití v mrazáku při teplotě $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.1.5 Postup měření

Ke zjištění procentuální inhibice cholinesteras bylo provedeno screeningové měření při koncentraci 100 μM . Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 8,3 μl roztoku enzymu (AChE nebo BuChE), 283 μl 5 mM DTNB a 8,3 μl testované látky rozpuštěné v DMSO, vše v triplicátu pro každou z měřených látek. K měření byl připraven také slepý vzorek v triplicátu,

kde do každé jamky bylo pipetováno 8,3 µl roztoku enzymu (AChE nebo BuChE), 283 µl 5 mM DTNB a 8,3 µl DMSO. Poté po dobu 1 minuty byla destička umístěna k promíchání na mikrotřepačku a následně byly látky inkubovány v komoře readeru při teplotě 37 °C po dobu 5 minut.

Po uplynutí času byla mikrotitrační destička vyjmuta z přístroje a do každé z jamek bylo přidáno 33,3 µl roztoku substrátu (ATChI nebo BuTChI) v koncentraci 10 mM. Po přidání substrátu byla měřena absorbance při vlnové délce 412 nm. Při měření byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu.

K výpočtu procentuální inhibice (% I) byl použit následující vzorec:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A (\text{slepý vzorek})}{\Delta A (\text{testovaná látka})} \right)$$

Kde % I je procentuální inhibice, ΔA (slepý vzorek) je nárůst absorbance slepého vzorku během 1 minuty a ΔA (testovaná látka) je absorbance testované látky během 1 minuty.

U látek, které vykazovaly při testované koncentraci inhibiční aktivitu vyšší než 50 % byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} . Ke zjištění hodnoty IC_{50} byla připravena koncentrační řada roztoků a pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody byla stejným způsobem, jako u stanovení procentuální inhibice, měřena absorbance při vlnové délce 412 nm.

Hodnoty IC_{50} byly vypočteny z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze pro Windows, výrobce GraphPad Software). Hodnoty IC_{50} byly porovnány s hodnotami známého inhibitoru cholinesteras, a to galanthaminem.

4.2.2 Test paralelního pronikání umělou membránou

S využitím metody PAMPA byla ověřena pasivní difuze látek přes umělou lipidovou membránu, a tedy předpoklad pro prostupnost látek přes HEB. Princip metody je uveden v kapitole 3.4.3.2.

4.2.2.1 Testované látky

Měření paralelního pronikání látek přes umělou membránu bylo provedeno s testovanými alkaloidy quebrachaminem, geissosreticulatinem, 1,2-didehydroaspidospermidinem a s novu látkou 2.

4.2.2.2 Použité chemikálie

- Dimethylsulfoxid, p. a. (Sigma Aldrich, Německo)
- Dodekan (Sigma Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's phosphate buffer saline, pH = 7,4) (Sigma Aldrich, USA)
- Polární mozkový lipid (Avanti, USA)

4.2.2.3 Použité přístroje

- Spektrofotometr Spark (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)

4.2.2.4 Příprava roztoků testovaných látek a sestavení kalibrační křivky

První den byly naváženy testované látky, které byly rozpuštěny v 90 μ l DMSO. K snazšímu rozpuštění látek byla využita ultrazvuková lázeň při teplotě 35 °C, po dobu 5 až 10 minut, a dále vortex k promíchání. Ze vzniklého zásobního roztoku bylo odebráno potřebné množství pro přípravu 100 μ M měřeného roztoku, u kterého byla měřena absorbance ke zjištění maxima absorpčního spektra. Měřený roztok byl připraven smísením 11 ml PBS a odebraného množství zásobního roztoku, tak aby koncentrace DMSO v roztoku nepřekročila 0,5 %. U každé z testovaných látek bylo měřeno absorpční spektrum s využitím spektrofotometru v oblasti 200 nm – 700 nm. Bylo zjištěno absorpční maximum pro každou z testovaných látek a byla odečtena vlnová délka pro nadcházející měření absorbance. Zjištěná vlnová délka testovaných látek pro měření absorbance je uvedena v Tabulce 9.

Tabulka 9 Zjištěná vlnová délka testovaných látek pro měření absorbance

Testované alkaloidy	Vlnová délka [nm]
Quebrachamin	280
Geissosreticulatin	234
1,2-didehydroaspidospermidin	234
Nová látka 2	248

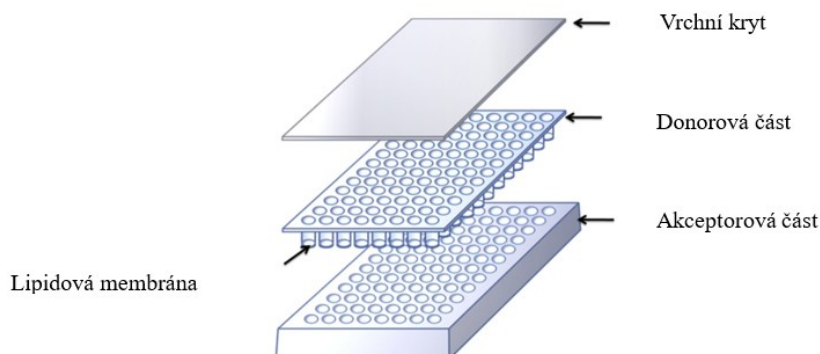
Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada s výchozí koncentrací roztoku 100 μ M, dále s použitím pufru PBS byly naředy koncentrace 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M a 6,25 μ M, a to pro každou z testovaných látek. Do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky bylo

pipetováno 200 μ l v triplikátu pro každou z pěti koncentrací a 200 μ l slepého vzorku v triplikátu pro každou z testovaných látek. S využitím spektrofotometru byla změřena absorbance testovaných látek při vlnové délce daného absorpčního maxima. Z výsledných údajů byla sestrojena kalibrační křivka a zjištěna její rovnice linearity. Kalibrační křivka vyjadřuje závislost měřené absorbance na koncentraci měřených roztoků.

4.2.2.5 Měření prostupu látek přes umělou lipidovou membránu

Pro kontrolu stability koncentrace výchozího 100 μ M roztoku bylo provedeno měření absorbance v čase přípravy a následně po 24 hodinách, 27 hodinách a 30 hodinách od přípravy. Vždy bylo pipetováno 200 μ l v triplikátu pro každou z testovaných látek a 200 μ l v triplikátu slepého vzorku.

Druhý den byla provedena zkouška prostupu testovaných látek přes lipidovou membránu. K tomu byla využita aparatura složená z 96-ti jamkové průhledné donorové a 96-ti jamkové bílé akceptorové mikrotitrační destičky (Obrázek 5). Vrchní donorová destička obsahovala na dně membránu, na kterou byly nanесeny 4 μ l PBL rozpuštěného v dodekanu o koncentraci 20 mg/ml, po nanесení vznikla umělá lipidová membrána. Do jamek dolní akceptorové části bylo pipetováno 300 μ l PBS, dále do jamek horní donorové části bylo pipetováno 300 μ l nejvyšší koncentrace od každé z testovaných látek v kvadruplikátu pro každou hodinu (tzn. pro odebrání měřených látek po 3, 4, 5 a 6 hodinách). Dále byla donorová a akceptorová část spojeny položením na sebe a byly inkubovány ve tmě za laboratorní teploty. V průběhu inkubace docházelo k pasivní difuzi testovaných látek přes umělou lipidovou membránu z donorové do akceptorové části.



Obrázek 5 96-ti jamková aparatura s donorovou a akceptorovou částí (modifikované podle:

Ask et al., 2019)

Po 3 hodinách od inkubace ve tmě bylo odebráno 200 µl z donorové i akceptorové části odpovídajících jamek pro každou z testovaných látek a těchto 200 µl bylo pipetováno do mikrotitrační destičky, taktéž bylo do destičky pipetováno 200 µl slepého vzorku pro každou z měřených látek. Poté byla měřena absorbance při odpovídající vlnové délce s použitím spektrofotometru.

Po odebrání byly testované látky opět inkubovány za laboratorní teploty ve tmě. Odebrání látek a měření absorbance bylo zopakováno stejným způsobem po následujících 4, 5 a 6 hodinách od přípravy.

Na konci měření byly připraveny roztoky s tzv. koncentrací ekvilibria, u kterých byla změřena absorbance. Koncentrace ekvilibria, tedy teoretická koncentrace, která simuluje rovnovážný stav v případě, že je membrána ideálně propustná. Roztok s teoretickou koncentrací byl připraven smísením 700 µl 100 µM roztoku testované látky a 700 µl PBS. U takto naředěného roztoku byla změřena absorbance při odpovídající vlnové délce.

4.2.2.6 Výpočet koeficientu permeability Pe

Vyhodnocení měření průchodu látek přes membránu bylo provedeno v tabulkovém softwaru Microsoft Excel, kde byla sestrojena kalibrační křivka a její rovnice linearit z předchozího měření. Na základě kalibrační křivky a rovnice linearit byla vypočtena koncentrace donorové a akceptorové části a taktéž koncentrace v ekvilibriu. S použitím níže zmíněné rovnice byl vypočítán koeficient permeability Pe pro každý časový bod a z výsledné hodnoty byla určena pravděpodobnost průchodu testovaných látek přes HEB.

Výpočet koeficientu permeability Pe podle následující rovnice:

$$\text{Log } Pe = \log \left[C \times -\ln \left(1 - \frac{[\text{látka}] \text{ akceptor}}{[\text{látka}] \text{ ekvilibrium}} \right) \right]$$

$$C = \left(\frac{Vd \times Va}{(Vd + Va) \times a \times t} \right)$$

Kde Vd je objem v donorové jamce (300 µl), Va je objem v akceptorové jamce (300 µl), $[\text{látka}] \text{ akceptor}$ je koncentrace látky v akceptorové jamce, $[\text{látka}] \text{ ekvilibrium}$ je koncentrace látky v teoretické rovnováze, a je plocha jamky (0,28 cm²) a t je čas měření (s).

4.2.3 Stanovení cytotoxicity za pomoci MTT testu s CHO-K1 a SH-SY5Y linií

Ke stanovení cytotoxicity testovaných alkaloidů *in vitro* byl využit MTT test, který je popsán v kapitole 3.5.2.1.

4.2.3.1 Testované látky

Stanovení cytotoxicity s CHO-K1 linií buněk bylo provedeno s testovanými alkaloidy quebrachaminem, geissosreticulatinem, 1,2-didehydroaspidospermidinem a s novu látkou 2. Stanovení cytotoxicity s SH-SY5Y linií bylo provedeno s testovanými alkaloidy quebrachaminem a 1,2-didehydroaspidospermidinem, které vykazovaly významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE.

4.2.3.2 Použité chemikálie

- Dimethylsulfoxid, p. a. (Sigma Aldrich, Německo)
- Fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, USA) (FBS)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's phosphate buffer saline, pH = 7,4) (Sigma Aldrich, USA)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, USA)
- Methylenová tetrazoliová sůl (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) (Sigma Aldrich, USA)
- Penicilin (10 000 U)/ streptomycin (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin: trypsin/ EDTA (0,25%) (Sigma Aldrich, USA)
- Živné médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Biosera, Francie)
- Živné médium F-12 Ham (Nutrient mixture F-12 Ham) (Sigma Aldrich, USA)

4.2.3.3 Použité buněčné linie

Buněčná linie CHO-K1 (*Chinese hamster ovary cell line*). Jedná se o adherentní ovariální buňky křečička čínského (*Cricetulus griseus*), které byly kultivovány v živném médiu F-12 Ham. Živné médium s přídavkem 10% FBS, 1% L-glutaminu a 1% roztoku antibiotik penicilin (10 000 U)/ streptomycin (10 mg/ml). Inkubace probíhala při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti. Buněčná linie SH-SY5Y je linie lidských neuroblastomových buněk, která se využívá pro testování neurotoxicity jako model buněk nervového systému. Tyto buňky byly kultivovány v médiu DMEM s přídavkem 10% FBS, 1% L-glutaminu, 1% roztoku antibiotik penicilin (10 000 U)/ streptomycin (10 mg/ml) a 1% roztoku neesenciálních aminokyselin. Inkubace probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti.

4.2.3.4 Použité přístroje

- Laminární box Heal Force (HFsafe-1200LA, Čína)
- Spektrofotometr Spark (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)

4.2.3.5 Postup kultivace adherentních buněk

Práce s buňkami byla vykonávána v sterilním prostředí laminárního boxu. Kultivace buněk byla prováděna dvakrát až třikrát týdně, podle rychlosti růstu buněk. Z nádoby s buňkami bylo odebráno staré kultivační médium a buňky byly opláchnuty 5 ml PBS, které bylo následně odebráno. Po oplachu buněk byl přidán 1 ml trypsinu a kultivační nádoba byla umístěna do inkubátoru (37 °C) na 5 min. Trypsin, který byl rovnoměrně rozprostřen po dně nádoby, byl využit pro uvolnění buněk ze dna. Po inkubaci byly buňky přeneseny do laminárního boxu, kde byly k buňkám pipetovány 4 ml nového kultivačního média. Vzniklá buněčná suspenze byla použita pro stanovení cytotoxicity, které předcházelo počítání buněk v Bürkerově komůrce.

4.2.3.6 Postup přípravy experimentu

Postup počítání a nasazení buněk byl stejný pro obě buněčné linie. Před stanovením cytotoxicity bylo nutné zjistit počet živých buněk v médiu, a to s využitím Bürkerovy komůrky. Práce s buňkami byla provedena v laminárním boxu, kde bylo do mikrozkušavky pipetováno 1,8 ml čistého média a 0,2 ml média s buňkami. Z takto připraveného roztoku bylo pipetováno 10 μ l na Bürkerovu komůrku pod krycí sklíčko. Za použití mikroskopu byl spočítán počet buněk a proveden výpočet. Na základě výpočtu byl zjištěn objem čistého média a objem média s buňkami, které byly smíseny a pipetovány do mikrotitrační destičky. Výpočet byl proveden tak, aby každá jamka obsahovala 10 000 buněk.

Multikanálovou pipetou byly nasazeny buňky (pasáž 7–18) do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Do každé jamky bylo pipetováno 50 μ l média s buňkami. Výjimkou byl poslední sloupec destičky, do kterého bylo pipetováno 50 μ l čistého média, a který sloužil jako tzv. blank (slepý vzorek). Tímto způsobem byly nasazeny buňky pro provedení testu cytotoxicity, které byly 24 hodin inkubovány při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti.

Kultivační nádoba byla doplněna médiem na celkový objem 10 ml a taktéž umístěna do inkubátoru. Na nádobu byl zapsán datum a číselné pořadí provedené pasáže.

4.2.3.7 Postup MTT testu

Postup provedení testu byl totožný pro obě buněčné linie. Druhý den byla nejprve zkontrolována životaschopnost a konfluence buněk v destičce pod mikroskopem. Poté byly připraveny zásobní roztoky testovaných látek rozpuštěné v DMSO a zředěné čistým médiem na požadovanou koncentraci. Koncentrace DMSO ve finálním roztoku aplikovaném na buňky by neměla přesáhnout 0,5 % (v/v). U každé z testovaných látek byla nejvyšší koncentrace naředěna tzv. dvojkovým ředěním na 8 koncentrací, které se nacházely v koncentračním rozmezí quebrachamin (800 – 6,25 μM), geissosreticulatin (1 000 – 7,81 μM), 1,2-didehydroaspidospermidin (600 – 4,69 μM), nová látka 2 (1 000 – 7,81 μM). Po zředění testovaných látek bylo do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky připravené z předchozího dne pipetováno 50 μl v tripletu čistého média do jamek pro kontrolu a slepého vzorku a 50 μl v tripletu od každé koncentrace testovaných látek do jamek s nasazenými buňkami. Celkem bylo v každé jamce 100 μl roztoku. Mikrotitrační destička byla umístěna do inkubátoru na 24 hodin při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti.

Třetí den byla po příchodu provedena s pomocí mikroskopu kontrola buněk a kontrola, zda došlo k vysrážení látek. V laminárním boxu bylo do každé jamky pipetováno 13 μl MTT a mikrotitrační destička byla umístěna na 1 hodinu do inkubátoru. Po inkubaci byly pozorovány vzniklé fialové krystaly pod mikroskopem, které vznikly redukcí tetrazoliové soli MTT na formazan. Poté byl z destičky opatrně odsát veškerý roztok do sucha, tak aby nedošlo k odstranění vzniklých krystalů ze dna destičky. Po odsátí bylo do všech jamek pipetováno 100 μl DMSO a destička byla umístěna na třepačku na 2 minuty. Přidáním DMSO došlo k rozpuštění krystalů a u vzniklého roztoku byla měřena absorbance s využitím spektrofotometru při vlnové délce 570 nm a 650 nm.

Hodnoty střední inhibiční koncentrace IC₅₀ byly vypočteny z naměřených hodnot nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze pro Windows, výrobce GraphPad Software).

5 VÝSLEDKY

5.1 Inhibiční aktivita látek vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase

Ke stanovení inhibiční aktivity testovaných látek byla využita *in vitro* Ellmanova spektrofotometrická metoda. Při screeningovém měření testovaných látek byly zjištěny hodnoty inhibiční aktivity vůči rekombinantním humánním enzymům AChE a BuChE. V Tabulce 10 jsou uvedeny procentuální hodnoty inhibiční aktivity testovaných alkaloidů vůči cholinesterasám. V Tabulce 10 je také uvedena hodnota inhibiční aktivity vůči AChE pro standard galanthamin. Jedná se o průměrné hodnoty z 3 samostatných měření, veškeré hodnoty jsou zaokrouhleny na 2 desetinná místa.

U testovaných alkaloidů, které vykazovaly inhibiční aktivitu vyšší než 50 % byla dále stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} . Z důvodu nedostatečného množství nové látky 1 nebylo stanovení hodnoty IC_{50} provedeno. Výsledné hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 Procentuální hodnoty inhibiční aktivity testovaných alkaloidů vůči cholinesterasám

Látka	Inhibice AChE [%] ± SEM	Inhibice BuChE [%] ± SEM	IC_{50} BuChE [μ M] ± SEM
Geissosreticulatin	1,89 ± 2,13	46,18 ± 0,29	–
Nová látka 1	16,21 ± 3,96	55,08 ± 1,47	–
Diastereomer geissoschizolinu	29,65 ± 3,22	34,24 ± 3,28	–
Nová látka 2	19,50 ± 2,13	45,46 ± 1,38	–
Quebrachamin	9,95 ± 1,92	95,07 ± 1,91	3,72 ± 0,05
1,2-didehydroaspidospermidin	0,17 ± 2,73	89,20 ± 0,38	10,71 ± 2,72
Galanthamin st	94,41 ± 0,49	68,23 ± 1,24	33,69 ± 2,66

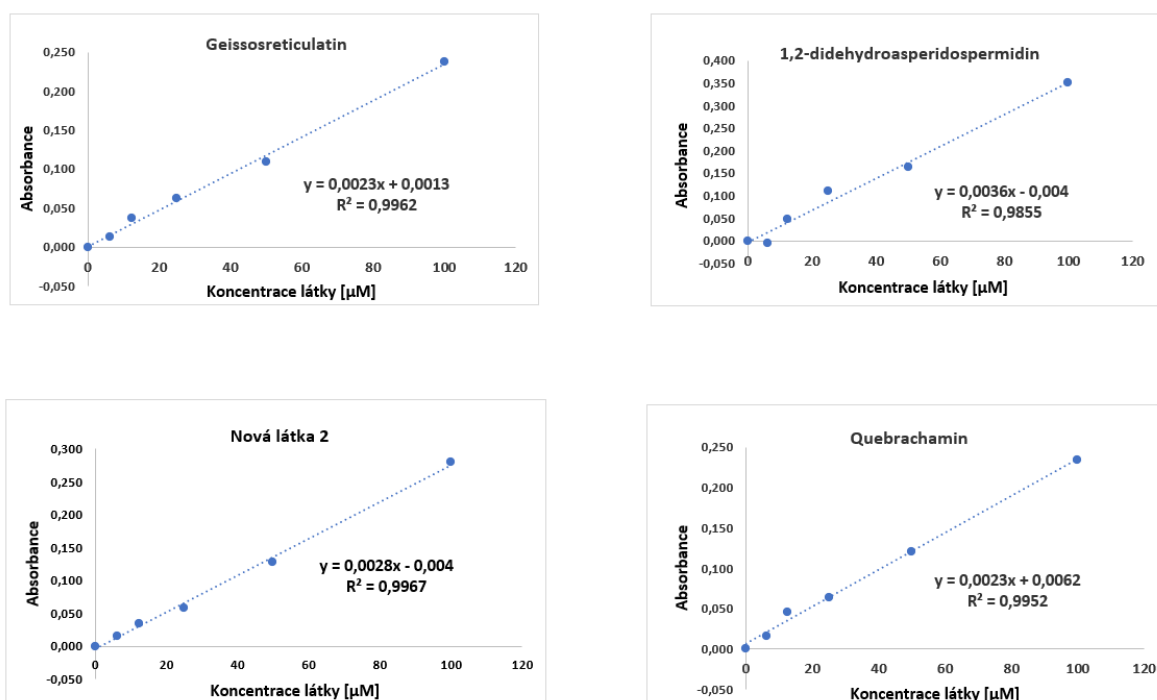
st standard

5.2 Test paralelního pronikání umělou membránou

Pomocí metody PAMPA byl ověřen předpoklad průniku testovaných alkaloidů přes HEB. Výsledky měření byly zpracovány v tabulkovém softwaru Microsoft Excel. K zajištění přesnosti měření byla pro každou z testovaných látek nejprve sestrojena kalibrační křivka a stanovena její rovnice linearity, která byla využita pro výpočet koncentrace testovaných látek v donorové a akceptorové jamce a k výpočtu koncentrace v ekvilibriu. Na Obrázku 6 jsou zobrazeny kalibrační křivky testovaných látek s jejich rovnicemi linearity.

Následně byla vypočtena hodnota koeficientu permeability P_e , která byla zjištěna z průměrných hodnot kvadruplikátů pro každý ze čtyřech časových úseků, tedy pro 3, 4, 5 a 6 hodin. Výsledná hodnota P_e zobrazená v Tabulce 11 je průměrnou hodnotou z 2 samostatných měření, která byla zaokrouhlena na 2 desetinná místa.

Z výsledných hodnot koeficientů permeability P_e byl stanoven předpoklad průniku testovaných alkaloidů přes umělou lipidovou membránu, a tedy předpoklad pro průnik látek přes HEB. V Tabulce 11 jsou uvedené také měřené hodnoty standardních látek (donepezil, obidoxim).



Obrázek 6 Kalibrační křivky a jejich rovnice linearity

Tabulka 11 Koeficient permeability Pe a předpokládaný průnik testovaných látek přes HEB

Látka	Pe [$\times 10^{-6}$ cm/s] \pm SEM	CNS (+/-)
Quebrachamin	27,78 \pm 4,12	CNS +
Geissosreticulatin	20,81 \pm 2,41	CNS +
1,2-didehydroaspidospermidin	12,41 \pm 2,65	CNS +
Nová látka 2	14,66 \pm 1,91	CNS +
Obidoxim st	2,59 \pm 0,28	CNS -
Donepezil st	24,93 \pm 1,90	CNS +

st standard

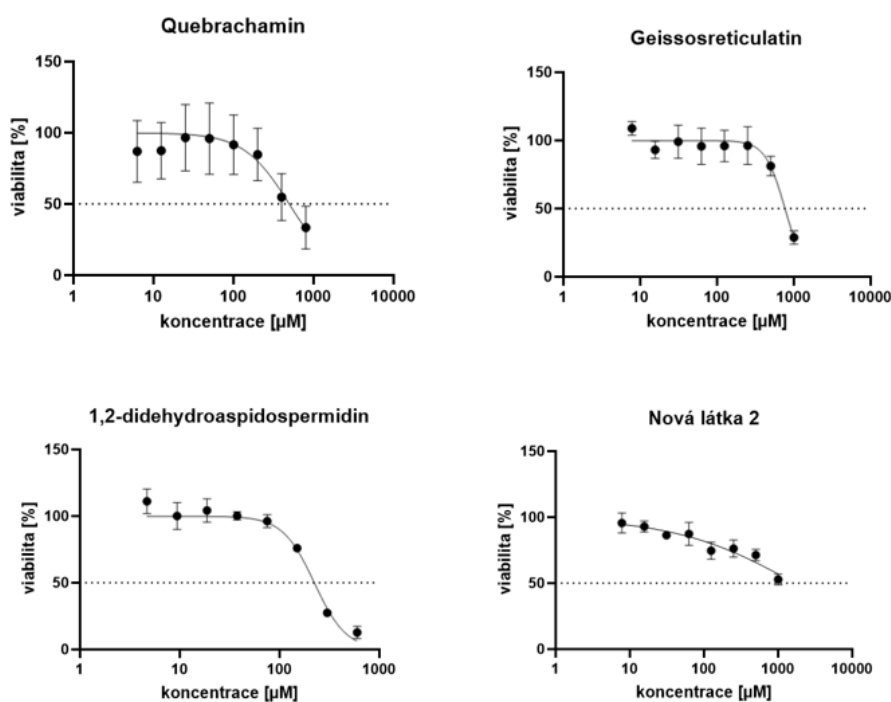
Testované alkaloidy můžeme rozdělit na ty, které dokáží procházet lipidovou membránou centrálního nervového systému (CNS+), a ty, které tuto bariéru překonat nemohou (CNS-). Pokud jsou látky označeny jako (CNS+), předpokládá se vysoká permeace HEB, což odpovídá hodnotám Pe ($\times 10^{-6}$ cm/s) $>4,0$. Látky, u kterých není permeace HEB zcela jistá, jsou označeny jako (CNS+/-), což odpovídá hodnotám Pe ($\times 10^{-6}$ cm/s) od 4,0 do 2,0. Látky s hodnotami Pe ($\times 10^{-6}$ cm/s) $<2,0$ jsou označeny jako (CNS-) a pravděpodobně přes HEB neprocházejí (Di et al., 2003).

5.3 MTT test s CHO-K1 linií

Hodnocení cytotoxicity testovaných alkaloidů *in vitro* bylo provedeno s linií adherentních buněk CHO-K1. Z naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty střední inhibiční koncentrace IC₅₀ pro každou z testovaných látek, které jsou uvedeny v Tabulce 12. Výsledná hodnota IC₅₀ udává koncentraci, při které je usmrceno 50 % buněk. Hodnoty IC₅₀ a níže znázorněné grafy byly zjištěny s použitím programu GraphPad Prism (verze pro Windows, výrobce GraphPad Software). Hodnoty IC₅₀ a viability uvedené v Tabulce 12 jsou průměrnou hodnotou z 3 samostatných měření a jsou zaokrouhleny na 2 desetinná místa.

Tabulka 12 Hodnoty IC₅₀ testovaných alkaloidů (s buněčnou linií CHO-K1)

Testované alkaloidy	IC ₅₀ [μM] ± SEM
Quebrachamin	505,35 ± 7,75
Geissosreticulatin	775,30 ± 7,50
1,2-didehydroaspidospermidin	252,35 ± 29,25
Nová látka 2	1757,50 ± 52,50



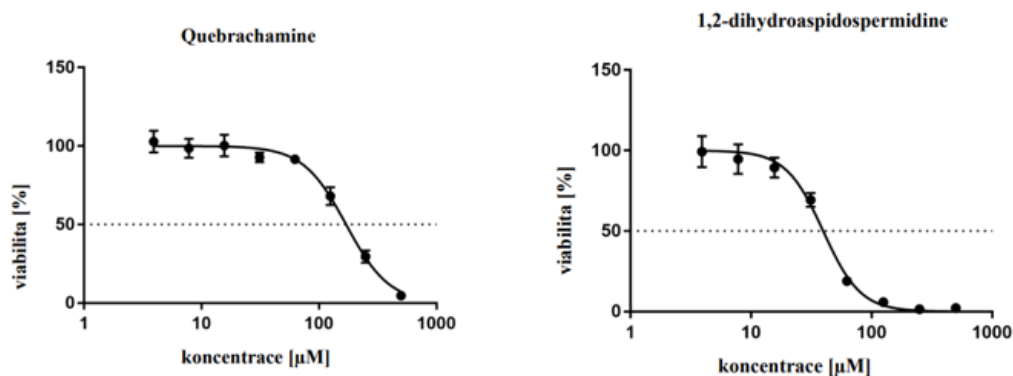
Obrázek 7 Grafy závislosti koncentrace testovaných alkaloidů na viabilitě CHO-K1 linie buněk

5.4 MTT test s SH-SY5Y linií

Hodnocení cytotoxicity testovaných alkaloidů s buněčnou linií SH-SY5Y (lidské neuroblastomové buňky) bylo provedeno u alkaloidů quebrachaminu a 1,2-didehydroaspidospermidinu, které vykazovaly významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE. Z naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty střední inhibiční koncentrace IC_{50} pro obě z testovaných látek, které jsou uvedeny v Tabulce 13. Hodnoty IC_{50} a níže znázorněné grafy byly zjištěny s použitím programu GraphPad Prism (verze pro Windows, výrobce GraphPad Software). Hodnoty IC_{50} uvedené v Tabulce 13 jsou průměrnou hodnotou z 3 samostatných měření a jsou zaokrouhleny na 2 desetinná místa. Grafy závislosti koncentrace testovaných alkaloidů na viabilitě SH-SY5Y linie buněk jsou uvedeny na Obrázku 8.

Tabulka 13 Hodnoty IC_{50} testovaných alkaloidů (s buněčnou linií SH-SY5Y)

Látka	IC_{50} [μ M] \pm SEM
Quebrachamin	222,07 \pm 44,00
1,2-didehydroaspidospermidin	44,83 \pm 3,91



Obrázek 8 Grafy závislosti koncentrace testovaných alkaloidů na viabilitě SH-SY5Y linie buněk

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Rod *Geissospermum* Allemão (Apocynaceae) je významným zdrojem především indolových alkaloidů. Do tohoto rodu je řazeno celkem 12 druhů, z toho ale pouze 6 druhů bylo doposud fytochemicky analyzováno (*G. argenteum*, *G. fuscum*, *G. vellosii*, *G. reticulatum*, *G. sericeum* a *G. urceolatum*). Již po mnoho let jsou jednotlivé druhy využívány v tradiční medicíně k léčbě malárie, nádorů, bakteriálních infekcí a bolesti (Sajkowska-Kozielewicz et al., 2020). Široké spektrum biologických aktivit tohoto rodu vedlo ke vzniku mnoha studií, které se zabývaly antiplazmodiální, antineoplastickou, protizánětlivou či anticholinesterasovou aktivitou (Li et al., 2019; Lima et al., 2016; Steele et al., 2002). Právě anticholinesterasová aktivita některých indolových alkaloidů tohoto rodu se stala předmětem testování v rámci inhibiční aktivity látek vůči AChE a BuChE. Potenciální inhibiční účinek testovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE je klíčový v terapii Alzheimerovy choroby. Z hlediska anticholinesterasové aktivity se jeví slibně některé izolované alkaloidy z *G. vellosii*, které byly testovány v rámci studie provedené Lima et al. (2009) a Lima et al. (2020).

Na základě primárního screeningu EtOAc extraktu z kůry *G. vellosii* byla zaznamenána významná inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE, s hodnotami střední inhibiční koncentrace pro AChE ($IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$) a pro BuChE ($IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$). Vzhledem k výsledkům studie byla kůra stromu *G. vellosii* doporučena k dalšímu podrobnějšímu hodnocení (Richter, 2022).

Cílem této diplomové práce bylo testování biologické aktivity izolovaných alkaloidů. Testované alkaloidy geissosreticulatin, 1,2-didehydroaspidospermidin, diastereomer geissoschizolinu, nová látka 1, quebrachamin a nová látka 2 byly izolovány z kůry stromu *G. vellosii*. Izolace testovaných alkaloidů proběhla na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové v rámci diplomových prací (Váňová, 2022; Vlková, 2022; Strašková, 2023; Pelnář, 2022).

Ke stanovení inhibiční aktivity cholinesteras byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Při screeningovém měření testovaných alkaloidů byly zjištěny procentuální hodnoty inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE. V rámci této diplomové práce byla inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE u alkaloidů nové látky 1, diastereomeru geissoschizolinu, nové látky 2 a geissosreticulatinu stanovena poprvé. Většina testovaných alkaloidů vykazovala nízkou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám. U testovaných látek (geissosreticulatin, diastereomer geissoschizolinu, nová látka 2) byly zjištěny nízké hodnoty inhibiční aktivity

(<50 %) vůči oběma enzymům (AChE i BuChE). Testované látky (quebrachamin, 1,2-didehydroaspidospermidin, nová látka 1) vykazovaly nízkou inhibiční aktivitu (<50 %) vůči enzymu AChE. V rámci hodnocení inhibiční aktivity vůči BuChE byly u testovaných alkaloidů (quebrachamin, 1,2-didehydroaspidospermidin, nová látka 1) naměřeny významné hodnoty. Nová látka 1 vykazovala hodnotu inhibiční aktivity vůči BuChE ($55,08 \pm 1,47$ %). U quebrachaminu (testovaný na katedře) byla naměřena velmi významná hodnota inhibiční aktivity vůči BuChE ($95,07 \pm 1,91$ %), stejně tak 1,2-didehydroaspidospermidin poskytl vysokou hodnotu inhibiční aktivity vůči BuChE ($89,20 \pm 0,38$ %). U testovaných látek s inhibiční aktivitou vyšší než 50 % byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} . Z důvodu nedostatečného množství nové látky 1 nebylo stanovení hodnoty IC_{50} provedeno. Hodnota IC_{50} pro testovanou látku 1,2-didehydroaspidospermidin vůči BuChE je ($10,71 \pm 2,72$ μ M), pro quebrachamin je hodnota IC_{50} vůči BuChE ($3,72 \pm 0,05$ μ M). Hodnoty střední inhibiční koncentrace vůči BuChE pro testované alkaloidy 1,2-didehydroaspidospermidin a quebrachamin jsou nižší než u již používaného léčiva galanthaminu (použitý jako standard) ($IC_{50} = 33,69 \pm 2,66$ μ M), a poskytují tak nejlepší výsledky v rámci hodnocení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám.

Lima et al. (2020) se zabývali hodnocením anticholinesterasové aktivity indolových alkaloidů izolovaných z PP, kde alkaloid geissoschizolin poskytl nejlepší výsledky. U tohoto alkaloidu byla mimo jiné hodnocena také schopnost inhibovat lidskou *hAChE* a *hBuChE*, dále byla hodnocena neuroprotektivní a protineurozánětlivá aktivita nebo také bezpečnostní profil molekuly. Geissoschizolin inhiboval oba enzymy *hAChE* i *hBuChE*, s vyšší účinností inhibice vůči *hBuChE*. Na základě měření byla zjištěna významná hodnota IC_{50} geissoschizolinu vůči *hBuChE* ($10,21 \pm 0,01$ μ M) a také vůči *hAChE* ($20,40 \pm 0,93$ μ M). Dále geissoschizolin prokázal v rámci hodnocení neuroprotektivní vlastnosti. Alkaloid geissoschizolin představuje nadějnou molekulu pro další testování a vývoj léčiv pro terapii Alzheimerovy choroby (Lima et al., 2020). Na základě naměřených hodnot střední inhibiční koncentrace vůči BuChE u látek 1,2-didehydroaspidospermidinu a quebrachaminu by bylo zajímavé u těchto alkaloidů provést podrobnější hodnocení v rámci anticholinesterasové aktivity.

Testované alkaloidy quebrachamin a 1,2-didehydroaspidospermidin se vyznačují selektivitou vůči enzymu BuChE. Ve studiích (Kořák et al., 2016 a Kamal et al., 2017) se zabývali vývojem *in vivo* aktivních selektivních inhibitorů BuChE. V rámci těchto studií proběhlo hodnocení inhibiční aktivity testovaných látek vůči BuChE (na zvířecích modelech), kde byla

potvrzena souvislost mezi etiopatogenezí Alzheimerovy choroby a aktivitou enzymu BuChE. Základem terapie Alzheimerovy choroby stále zůstávají selektivní inhibitory AChE (galanthamin, donepezil) a neselektivní inhibitor AChE a BuChE (rivastigmin), nicméně selektivní inhibitory BuChE jsou předmětem rozsáhlého výzkumu (Kořák et al., 2016; Kamal et al., 2017). Inhibice BuChE se stává cílem pro vývoj nových léčiv pro terapii Alzheimerovy choroby, z toho důvodu by testované alkaloidy quebrachamin a 1,2-didehydroaspidospermidin mohly představovat slibný vzor pro vývoj nových léčiv.

Látky, které se používají při terapii Alzheimerovy choroby, působí na centrální úrovni a je tedy důležité, aby pronikaly přes HEB. Z toho důvodu byly testované alkaloidy (quebrachamin, geissosreticulatin, 1,2-didehydroaspidospermidin, nová látka 2) podrobeny metodě PAMPA, k ověření předpokladu průniku přes HEB pasivní difuzí. Z výsledných hodnot permeačního koeficientu P_e lze předpokládat, že všechny testované alkaloidy budou pronikat do mozku pasivně. Výsledné hodnoty permeačního koeficientu P_e testovaných alkaloidů byly porovnány s hodnotami standardů. Jeden ze standardů představoval donepezil, který se používá v léčbě Alzheimerovy choroby a průnik do mozku je u něj známý. Naopak druhý ze standardů obidoxim do mozku neproniká.

Nicméně metoda PAMPA nedokáže ověřit přestup látek přes HEB s využitím aktivních transportérů. Pro komplexní hodnocení přestupu testovaných alkaloidů přes HEB do mozku by bylo vhodné využít také metody, které aktivní transport zahrnují. Jako model lidské HEB se v praxi využívá např. lidská cerebrální endoteliální buněčná linie hCMEC/D3 (Weksler et al., 2013).

Z hlediska hodnocení bezpečnostního profilu testovaných alkaloidů bylo provedeno hodnocení cytotoxicity s použitím MTT testu. U testovaných alkaloidů (quebrachamin, geissosreticulatin, 1,2-didehydroaspidospermidin, nová látka 2) bylo provedeno měření cytotoxicity na CHO-K1 buňkách. Výsledkem bylo získání hodnoty koncentrace IC_{50} , při které je usmrceno 50 % buněk. Čím je hodnota IC_{50} vyšší, tím je toxicita testované látky nižší. Testovaná látka quebrachamin vykazovala významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE s hodnotou $IC_{50} = 3,72 \pm 0,05 \mu M$. Při hodnocení cytotoxicity quebrachaminu byla hodnota $IC_{50} = 505,35 \pm 7,75 \mu M$, z čehož lze vyvodit, že quebrachamin by měl být při účinné koncentraci pro buňky bezpečný. Další látkou, která vykazovala zajímavou inhibiční aktivitu vůči BuChE byl 1,2-didehydroaspidospermidin s hodnotou $IC_{50} = 10,71 \pm 2,72 \mu M$. Pro látku 1,2-didehydroaspidospermidin byla stanovena cytotoxicita s hodnotou $IC_{50} = 252,35 \pm 29,25 \mu M$,

z čehož lze usoudit, že 1,2-didehydroaspidospermidin by měl být opět pro buňky bezpečný při účinné koncentraci. Významná z hlediska hodnocení inhibiční aktivity vůči BuChE byla taktéž nová látka 1, u které z důvodu nedostatečného množství vzorku nebyla stanovena hodnota IC_{50} .

Hodnocení cytotoxicity bylo provedeno taktéž s buněčnou linií lidských neuroblastomových SH-SY5Y buněk, která se využívá pro testování neurotoxicity jako model buněk nervového systému. Testování cytotoxicity s využitím MTT testu bylo provedeno u látek quebrachaminu a 1,2-didehydroaspidospermidinu, které byly významné z hlediska hodnocení inhibiční aktivity vůči BuChE. Při hodnocení cytotoxicity byla zjištěna hodnota $IC_{50} = 222,07 \pm 44,00 \mu\text{M}$ (quebrachamin) a $IC_{50} = 44,83 \pm 3,91 \mu\text{M}$ (1,2-didehydroaspidospermidin). Látka quebrachamin by měla být z hlediska hodnocené cytotoxicity na buňkách SH-SY5Y bezpečná při účinné koncentraci. U látky 1,2-didehydroaspidospermidinu je významný rozdíl z hlediska hodnoty IC_{50} v rámci hodnocení na buňkách CHO-K1 a buňkách SH-SY5Y. Při hodnocení 1,2-didehydroaspidospermidinu na buněčné linii SH-SY5Y byla zjištěna vyšší cytotoxicita.

Z hlediska zajímavých hodnot, zjištěných při hodnocení biologické aktivity quebrachaminu, se jeví tato látka jako významná pro další testování v souvislosti s potenciální využitím k terapii Alzheimerovy choroby.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- 1 Abbott, N. J. (2004). Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.014>
- 2 Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- 3 Anand, P., & Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 36(4), 375–399. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0036-3>
- 4 Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier.
- 5 Ask, K. S., Lid, M., Øiestad, E. L., Pedersen-Bjergaard, S., & Gjelstad, A. (2019). Liquid-phase microextraction in 96-well plates - calibration and accurate quantification of pharmaceuticals in human plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 1602, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.013>
- 6 Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In M. L. Larramendy & S. Soloneski (Eds.), *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. *InTech*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- 7 Bastos, M. L. C., Silva-Silva, J. V., Cruz, J. N., Da Silva, A. R. P., Bentaberry-Rosa, A. A., Da Costa Ramos, G., De Sousa Siqueira, J. E., Coelho-Ferreira, M., Percário, S., Marinho, P. S. B., Marinho, A. M. D. R., De Oliveira Bahia, M., & Dolabela, M. F. (2023). Alkaloid from *Geissospermum sericeum* Benth. & Hook.f. ex Miers (Apocynaceae) Induce Apoptosis by Caspase Pathway in Human Gastric Cancer Cells. *Pharmaceuticals*, 16(5), 765. <https://doi.org/10.3390/ph16050765>
- 8 Bemis D. L., Capodice J. L., Desai M., Katz A. E. & Buttyan R. (2013). β -Carboline Alkaloid–Enriched Extract from the Amazonian Rain Forest Tree Pao Pereira Suppresses Prostate Cancer Cells. *Journal of Integrative Oncology*, 7(2), 59–65.
- 9 Bhadane, B. S., Patil, M. P., Maheshwari, V. L., & Patil, R. H. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1181–1210. <https://doi.org/10.1002/ptr.6066>
- 10 Bratosin, D., Mitrofan, L., Pali, C. G., Estaquier, J., & Montreuil, J. (2005). Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A*, 66(1), 78–84. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20152>

- 11 Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules*, 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- 12 Buranaamnuay, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 251.
- 13 Camargo, M. R. M., Amorim, R. C. D. N., Silva, L. F. R. E., Carneiro, A. L. B., Vital, M. J. S., & Pohlit, A. M. (2013). Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.). *Revista Fitos*, 8(2). <https://doi.org/10.5935/1808-9569.20130002>
- 14 Cardoso, F. L., Brites, D., & Brito, M. A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews*, 64(2), 328–363. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.05.003>
- 15 Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer research*, 47(4), 936-942.
- 16 Carpenter, T. S., Kirshner, D., Lau, E. Y., Wong, S. E., Nilmeier, J. P., & Lightstone, F. C. (2014). A method to predict Blood-Brain barrier permeability of Drug-Like compounds using molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 107(3), 630–641. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.024>
- 17 Correia A. F., Segovia J. F., Gonçalves M. C. (2008). Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 12(6), 2008, 369-80.
- 18 Crouch, S. P. M., Kozlowski, R. Z., Slater, K., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-u](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-u)
- 19 Cuartero, M., Ortuño, J., García, M. I. R., & García-Cánovas, F. (2012). Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.008>
- 20 Čolović, M. B., Krstić, D., Lazarević-Pašti, T., Bondžić, A. M., & Vasić, V. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159x113111030006>
- 21 Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>

- 22 Debnath, B., Singh, W. S., Das, M., Goswami, S., Singh, M. K., Maiti, D., & Manna, K. (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry*, 9, 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>
- 23 Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- 24 Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J., & Carter, G. T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(3), 223–232. [https://doi.org/10.1016/s0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/s0223-5234(03)00012-6)
- 25 Dingová, D., Leroy, J., Check, A., Garaj, V., Krejci, É., & Hrabovská, A. (2014). Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman’s assay. *Analytical Biochemistry*, 462, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.031>
- 26 Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- 27 Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>
- 28 Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *CSH Protocols*, 2016(4), <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- 29 Global Biodiversity Information Facility (n.d.). *Apocynaceae*. Retrieved April 4, 2024 from <https://www.gbif.org/species/6701>
- 30 Global Biodiversity Information Facility (n.d.). *Geissospermum laeve (Vell.) Miers*. Retrieved April 4, 2024 from <https://www.gbif.org/species/8371626>
- 31 Holas, O., Musílek, K., Pohanka, M., & Kuča, K. (2012). The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(12), 1207–1223. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.729037>
- 32 Chatonnet, A., & Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 260(3), 625–634. <https://doi.org/10.1042/bj2600625>

- 33 Chen, Y., & Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(7), 640–665. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>
- 34 Johnson, C. D., & Russell, R. L. (1975). A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Analytical Biochemistry*, *64*(1), 229–238. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90423-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90423-6)
- 35 Kamal, M. A., Shakil, S., Nawaz, M. S., Yu, Q., Tweedie, D., Tan, Y., Qu, X., & Greig, N. H. (2017). Inhibition of Butyrylcholinesterase with Fluorobenzylcymserine, An Experimental Alzheimer’s Drug Candidate: Validation of Enzoinformatics Results by Classical and Innovative Enzyme Kinetic Analyses. *CNS & Neurological Disorders. Drug Targets*, *16*(7). <https://doi.org/10.2174/1871527316666170207160606>
- 36 Kamiloglu, S., Sarı, G., Özdal, T., & Çapanoğlu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, *1*(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- 37 Kansy, M., Avdeef, A., & Fischer, H. (2004). Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discovery Today: Technologies*, *1*(4), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.013>
- 38 Kansy, M., Senner, F., & Gubernator, K. (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, *41*(7), 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>
- 39 Kaur, C., & Ling, E. A. (2017). The circumventricular organs. *Histol Histopathol.* *32*(9), 879–892. <https://doi.org/10.14670/HH-11-881>
- 40 Kaushal, J., Khatri, M., & Arya, S. K. (2021). A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *207*, 111483. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111483>
- 41 Košak, U., Brus, B., Knez, D., Šink, R., Žakelj, S., Trontelj, J., Pišlar, A., Šlenc, J., Gobec, M., Živin, M., Tratnjek, L., Perše, M., Sařat, K., Podkova, A., Filipek, B., Nachon, F., Brazzolotto, X., Więckowska, A., Malawska, B., Gobec, S. (2016). Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep39495>
- 42 Li, J., Huang, Y., Kuo, Y., Cheng, C., Kuan, F., Chang, S., Lee, Y., Chin, C., & Shi, C. (2019). Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers*, *11*(7), 1034. <https://doi.org/10.3390/cancers11071034>

- 43 Lima, J. A., Da Costa, R. S., Epifanio, R. A., Castro, N. G., Rocha, M. C., & Pinto, Â. C. (2009). Geissospermum vellosii stem bark. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 92(3), 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.01.024>
- 44 Lima, J. A., Da Costa, T. W. R., Da Fonseca, A. C. C., Amaral, R. F. D., Nascimento, M. D. D. S. B., Santos-Filho, O. A., Miranda, A. L. P., Neto, D. C. F., Lima, F. R. S., Hamerski, L., & Tinoco, L. W. (2020). Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104215. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>
- 45 Lima, J. A., Da Costa, T. W. R., Silva, L. L., Miranda, A. L. P., & Pinto, Â. C. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a Geissospermum vellosii stem bark fraction. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 88(1), 237–248. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140374>
- 46 Lohmann, C., Hüwel, S., & Galla, H. (2002). Predicting Blood-Brain barrier permeability of drugs: Evaluation of different in vitro assays. *Journal of Drug Targeting*, 10(4), 263–276. <https://doi.org/10.1080/10611860290031903>
- 47 Marston, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 51–54. <https://doi.org/10.1002/pca.623>
- 48 Mbeunkui, F., Grace, M. H., Lategan, C., Smith, P. J., Raskin, I., & Lila, M. A. (2012). In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of Geissospermum vellosii. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.036>
- 49 Mensch, J., Oyarzábal, J., Mackie, C., & Augustijns, P. (2009). In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(12), 4429–4468. <https://doi.org/10.1002/jps.21745>
- 50 Miao, Y., He, N., & Zhu, J. (2010). History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chemical Reviews*, 110(9), 5216–5234. <https://doi.org/10.1021/cr900214c>
- 51 Mosmann, T. R. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- 52 Mühlbacher, M., Spitzer, G. M., Liedl, K. R., & Kornhuber, J. (2011). Qualitative prediction of blood–brain barrier permeability on a large and refined dataset. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 25(12), 1095–1106. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9478-1>
- 53 Mushtaq, G., Greig, N. H., Khan, J. A., & Kamal, M. A. (2014). Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer Disease and Type 2

Diabetes Mellitus. *Cns & Neurological Disorders-drug Targets*, 13(8), 1432–1439. <https://doi.org/10.2174/1871527313666141023141545>

- 54 Nicolazzo, J. A., Charman, S. A., & Charman, W. N. (2006). Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(3), 281–293. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.3.0001>
- 55 O'Brien, J., Wilson, I. D., Orton, T. C., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- 56 Omar, F., Tareq, A. M., Alqahtani, A., Dhama, K., Sayeed, M. A., Emran, T. B., & Simal-Gándara, J. (2021). Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Molecules*, 26(8), 2297. <https://doi.org/10.3390/molecules26082297>
- 57 Pardridge, W. M. (1999). Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of NeuroVirology*, 5(6), 556–569. <https://doi.org/10.3109/13550289909021285>
- 58 Pardridge, W. M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: The future of brain drug development. *Molecular Interventions*, 3(2), 90–105. <https://doi.org/10.1124/mi.3.2.90>
- 59 Patočka, J., Kuča, K., & Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica*, 47(4), 215–228. <https://doi.org/10.14712/18059694.2018.95>
- 60 Pelnář, T. (2022). Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity VIII. [Magisterská diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]. Digitální repozitář Univerzity Karlovy. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/174439>
- 61 Pohanka, M. (2014). Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9809–9825. <https://doi.org/10.3390/ijms15069809>
- 62 Reina, M., Ruiz-Mesía, W., López-Rodríguez, M., Mesía, L. R., González-Coloma, A., & Martínez-Díaz, R. A. (2012). Indole Alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Journal of Natural Products*, 75(5), 928–934. <https://doi.org/10.1021/np300067m>
- 63 Richter, L. (2022). Screeningová studie různých rostlinných taxonů a jejich vliv na lidské enzymatické systémy II. [Rigorózní práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]. Digitální repozitář Univerzity Karlovy. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/174725>

- 64 Rubas, W., Cromwell M. E. M., Shahrokh Z., Villagran J., Nguyen T.-N., Wellton M., Nguyen T.-H., & Mrsny R. J. (1996). Flux Measurements across Caco-2 Monolayers May Predict Transport in Human Large Intestinal Tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences: a publication of the American Pharmaceutical Association*, 85(2), 165–169. <https://doi.org/10.1021/js950267+>
- 65 Sajkowska-Kozielewicz, J. J., Kozielewicz, P., Makarova, K., Stocki, M., Barnes, N. M., & Paradowska, K. (2020). Geissospermiculate, a New Alkaloid from *Geissospermum reticulatum* Bark. *Molecules*, 26(1), 143. <https://doi.org/10.3390/molecules26010143>
- 66 Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D. & Boyd M. R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*, 48(17), 4827–4833.
- 67 Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J. L., & Van Der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397(10284), 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32205-4)
- 68 Sloan, C. D. K., Nandi, P., Linz, T. H., Aldrich, J. V., Audus, K. L., & Lunte, S. M. (2012). Analytical and biological methods for probing the Blood-Brain barrier. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5(1), 505–531. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143002>
- 69 Stebbins, M. J., Wilson, H. K., Canfield, S. G., Qian, T., Palecek, S. P., & Shusta, E. V. (2016). Differentiation and characterization of human pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial cells. *Methods*, 101, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.10.016>
- 70 Steele, J., Veitch, N. C., Kite, G. C., Simmonds, M. S. J., & Warhurst, D. C. (2002). Indole and β -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *Journal of Natural Products*, 65(1), 85–88. <https://doi.org/10.1021/np0101705>
- 71 Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- 72 Strašková, V. (2023). Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity VII. (Publication no. 239266) [Magisterská diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]. Digitální repozitář Univerzity Karlovy. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/181130>
- 73 Strober, W. (1997). Trypan Blue Exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

- 74 Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zloković, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From physiology to disease and back. *Physiological Reviews*, *99*(1), 21–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- 75 Świt, P., Pollap, A., & Orzeł, J. (2023). Spectroscopic Determination of Acetylcholine (ACH): A Representative review. *Topics in Current Chemistry*, *381*(4). <https://doi.org/10.1007/s41061-023-00426-9>
- 76 Váňová, L. (2022). Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity VI. (Publication no. 228034) [Magisterská diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]. Digitální repozitář Univerzity Karlovy. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/174443>
- 77 Vlková, M. (2022). Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity V. (Publication no. 217050) [Magisterská diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové]. Digitální repozitář Univerzity Karlovy. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/176868>
- 78 Weksler, B. B., Romero, I. A., & Couraud, P. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16>
- 79 Yu, J., & Chen, Q. (2013). The plant extract of *Pao pereira* potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*, *52*(1), 36–43. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.808232>

8 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Studentka: Nikola Kosinová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jiří Janoušek, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení biologické aktivity léčiv přírodního původu II.

V této diplomové práci jsem se zaměřila na studium biologické aktivity testovaných alkaloidů izolovaných z kůry kmene *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae). *G. vellosii* je jihoamerický strom patřící do rodu *Geissospermum* Allemão, který je významný z hlediska přítomnosti obsahových látek (především indolových alkaloidů). V tradiční medicíně se již po mnoho let využívají obsahové látky tohoto rodu k léčbě malárie, nádorů, bakteriálních infekcí a bolesti. Izolované indolové alkaloidy byly zkoumány z hlediska antineoplastické, anticholinesterasové, analgetické, antimalarické či protizánětlivé aktivity. Některé z izolovaných alkaloidů se vyznačují významnou biologickou aktivitou, a právě anticholinesterasová aktivita se stala předmětem zkoumání této diplomové práce. Významná anticholinesterasová aktivita testovaných alkaloidů představuje slibný zdroj pro vývoj nových léčiv k léčbě Alzheimerovy choroby.

Testované alkaloidy byly hodnoceny z hlediska inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE pomocí Ellmanovy metody. Významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE vykazovaly alkaloidy quebrachamin a 1,2-didehydroaspidospermidin, s hodnotami střední inhibiční koncentrace $IC_{50} = 3,72 \pm 0,05 \mu M$ a $IC_{50} = 10,71 \pm 2,72 \mu M$. U testovaných alkaloidů byl ověřen předpoklad průniku přes HEB pomocí metody PAMPA, na základě kterého byl potvrzen průnik pasivní difuzí těchto látek přes HEB. Poté proběhlo hodnocení cytotoxicity s využitím testu MTT na buňkách CHO-K1 a buňkách SH-SY5Y. Na základě výsledků MTT testu na obou buněčných liniích byl alkaloid quebrachamin vyhodnocen jako bezpečný pro buňky při účinné koncentraci.

Klíčová slova: Acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Alzheimerova choroba, *Geissospermum* Allemão, biologická aktivita

9 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical botany

Student: Nikola Kosinová

Head of diploma thesis: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Jiří Janoušek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Biological activity evaluation of substances of natural origin II.

In this thesis, I focused on studying the biological activity of the tested alkaloids isolated from the bark of the *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae) stem. *G. vellosii* is a South American tree belonging to the genus *Geissospermum* Allemão, which is important in terms of the presence of active substances (mainly indole alkaloids). In traditional medicine, the active substances of this genus have been used for many years to treat malaria, tumors, bacterial infections, and pain. The isolated indole alkaloids were studied for their antineoplastic, anticholinesterase, analgesic, antimalarial, and anti-inflammatory activities. Some of the isolated alkaloids have significant biological activity, and it was the anticholinesterase activity that became the subject of this thesis. The significant anticholinesterase activity of the tested alkaloids represents a promising source for the development of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease.

The tested alkaloids were evaluated for their inhibitory activity against AChE and BuChE using the Ellman method. The alkaloids quebrachamine and 1,2-didehydroaspidospermidine showed significant inhibitory activity against BuChE, with IC_{50} values of $3,72 \pm 0,05 \mu\text{M}$ and $10,71 \pm 2,72 \mu\text{M}$, respectively. The assumption of penetration through the HEB was verified for the tested alkaloids using the PAMPA method, which confirmed the penetration of these substances through the HEB by passive diffusion. Cytotoxicity was then evaluated using the MTT test on CHO-K1 and SH-SY5Y cells. Based on the results of the MTT test on both cell lines, the alkaloid quebrachamin was evaluated as safe for cells at an effective concentration.

Key words: Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease, *Geissospermum* Allemão, biological activity